PARIJS

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.:
A.O. 10969

THÈSE

DE

DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES PHYSIQUES

présentée

A L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

par

Bernard VALEUR

pour obtenir
LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet:

Dynamique des chaînes macromoléculaires - Analyse théorique et étude expérimentale par polarisation de fluorescence

---

Soutenue le 11 Juin 1975 devant la Commission d'Examen :

M. G. CHAMPETIER	Président
M. P.-G. DE GENNES	Examinateurs
M. C. QUIVORON	
M. L. MONNERIE	
M. J.-B. LE PECQ	

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.:
A.O. 10969

THÈSE

DE

DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES PHYSIQUES

présentée

A L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

par

Bernard VALEUR

pour obtenir
LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet:

Dynamique des chaînes macromoléculaires - Analyse théorique et étude expérimentale par polarisation de fluorescence

---

Soutenue le 11 Juin 1975 devant la Commission d'Examen :

M. G. CHAMPETIER	**Président**
M. P.-G. DE GENNES	**Examinateurs**
M. C. QUIVORON	
M. L. MONNERIE	
M. J.-B. LE PECQ	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été effectué au laboratoire de Physico-chimie Structurale et Macromoléculaire de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris, sous la direction de MM. les Professeurs G. CHAMPETIER et L. MONNERIE.

Que Monsieur le Professeur G. CHAMPETIER, membre de l'Institut, Directeur de l'E.S.P.C.I., trouve ici le témoignage de mon admiration et l'expression de ma reconnaissance pour la confiance dont il m'a toujours honoré.

Ma gratitude va tout particulièrement à M. L. MONNERIE, professeur à l'E.S.P.C.I., pour l'aide précieuse qu'il n'a cessé de m'apporter dans l'élaboration de ce travail. Son dévouement constant, sa haute compétence et son dynamisme ont été pour moi le soutien le plus sûr. Je le prie de croire à ma profonde reconnaissance.

Je voudrais, d'autre part, remercier sincèrement M. P.-G. DE GENNES, professeur au Collège de France, des conseils qu'il m'a prodigués sur le plan théorique. Je lui suis très reconnaissant ainsi qu'à M. le professeur C. QUIVORON pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce mémoire.

Je remercie vivement M. P. REMPP, Directeur de recherche au C.N.R.S., M. le Professeur P. SIGWALT et Melle S. BOILEAU, de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires pour y effectuer des polymérisations anioniques.

M. le Professeur J.-B. LE PECQ a souvent manifesté de l'intérêt pour mon travail et a bien voulu faire partie du jury de ma thèse. Qu'il trouve en ces lignes mes sincères remerciements.

Je tiens à témoigner ma gratitude à MM. F. GENY, J.-P. JARRY et J. MOIREZ pour les fructueuses discussions que nous avons eues ensemble.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme P. RAMEAU pour sa participation efficace à la réalisation matérielle de ce texte.

Que tous mes amis du laboratoire trouvent ici l'expression de ma très vive sympathie.

S O M M A I R E

INTRODUCTION p. 4

PREMIERE PARTIE : ANALYSE THEORIQUE 7

I-1. Description du modèle 11

I-2. Equations générales d'évolution 14

I-2-1. Définitions 14
I-2-2. Expression générale de la fonction de corrélation d'orientation 15
I-2-3. Fonction de corrélation initiale 18

I-3. Expressions analytiques des fonctions de corrélation et d'autocorrélation pour une chaîne soumise à des mouvements à trois liaisons 21

I-4. Application à l'étude du comportement dynamique des chaînes 27

I-4-1. Notion d'unité cinétique indépendante 27
I-4-2. Distribution des temps de relaxation 28
I-4-3. Influence du bout de la chaîne 28
I-4-4. Cas des polymères réticulés 31

I-5. Comportement d'une chaîne hors réseau 32

DEUXIEME PARTIE : THEORIES ET MESURES DE L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE 35

II-1. Mesure de l'anisotropie moyenne 39

II-2. Mesure du déclin de l'anisotropie 42

II-2-1. Appareillage 42

II-2-2. Analyse des courbes de déclin par la méthode des fonctions modulatrices 48

II-3. Théories de la polarisation de fluorescence 58

II-3-1. Molécules sphériques 58
II-3-2. Molécules ellipsoïdales 59
II-3-3. Molécules asymétriques rigides 59
II-3-4. Macromolécules flexibles 60

II-4. Comparaison des méthodes de détermination des temps de relaxation 62

II-4-1. Mesure de la polarisation en excitation continue 62
II-4-2. Mesure du déclin de l'anisotropie 63
II-4-3. Mesures couplées d'inhibition et de polarisation 64 65

TROISIEME PARTIE : ETUDE PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE DU MOUVEMENT BROWNIEN DU POLYSTYRENE EN SOLUTION 67

III-1. Application de la polarisation de fluorescence à l'étude des polymères en solution 68

III-2. Synthèse d'un polystyrène possédant un fluorophore inséré dans la chaîne 71

III-2-1. Choix du fluorophore 71
III-2-2. Principe de la méthode d'insertion 72
III-2-3. Polymérisation et couplage 73

III-3. Caractéristiques spectrales du polystyrène marqué 76

III-3-1. Spectres, coefficient d'extinction 76
III-3-2. Durée de vie 78

III-4. Mesure du déclin de l'anisotropie de fluorescence 82

III-4-1. Allure des courbes de décroissance 84
III-4-2. Influence de la viscosité 90
III-4-3. Influence de la conformation de la chaîne 94

III-5. Mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence 97

III-6. Comparaison avec un polystyrène possédant un fluorophore fixé latéralement à la chaîne 104

III-6-1. Mesure du déclin de l'anisotropie de fluorescence 105

III-6-2. Mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence 110

CONCLUSION 114

ANNEXE : Méthode des fonctions modulatrices 117

BIBLIOGRAPHIE 126

I N T R O D U C T I O N

L'étude de la dynamique des chaînes macromoléculaires présente un grand intérêt pour la compréhension de certaines propriétés des macromolécules, notamment le comportement mécanique des polymères synthétiques ou naturels, et certains processus biologiques tels que la flexibilité des anticorps. Ces propriétés dépendent non seulement de la structure conformationnelle des chaînes, mais aussi de la vitesse à laquelle de petits groupes de chaînons peuvent passer d'une conformation à une autre.

Divers approches théoriques ont été proposées pour aborder l'étude de ces phénomènes. Il nous a paru intéressant d'approfondir le modèle, préalablement conçu au laboratoire, d'une chaîne inscrite dans un réseau tétraédrique et soumise à des mouvements à trois et quatre liaisons.

Pour suivre expérimentalement les mouvements des chaînes, diverses techniques ont été utilisées, à savoir les relaxations diélectrique et ultrasonore, les résonances magnétique nucléaire et paramagnétique électronique, la polarisation de fluorescence. Dans notre cas, nous avons retenu la méthode de la polarisation de la fluorescence émise par un fluorophore inséré dans la chaîne. Pour obtenir directement les temps de relaxation, nous avons construit un appareil permettant d'enregistrer au cours du temps les composantes polarisées de la fluorescence excitée par un flash. Les résultats obtenus ont été complétés à l'aide de mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence.

Afin de se placer dans les meilleures conditions pour contrôler la validité de la théorie élaborée, nous avons été conduits à effectuer la synthèse d'un polystyrène contenant un fluorophore anthracénique au milieu de la chaîne, dont la direction du moment de transition est suivant l'axe de la chaîne.

Par ailleurs, l'influence de la viscosité sur les temps de relaxation a été examinée, tant sur le polystyrène considéré, que sur un échantillon de polystyrène possédant un groupement anthracénique en chaîne latérale.

Notre exposé comprendra tout d'abord une analyse théorique des mouvements locaux des chaînes macromoléculaires, puis une description des techniques, théories et méthodes de la polarisation de fluorescence. Enfin, nous examinerons les résultats obtenus sur le polystyrène en solution.

Première partie

ANALYSE THEORIQUE

La mécanique statistique des processus irréversibles appliquée aux solutions macromoléculaires a été formulée de façon générale dans la théorie de KIRKWOOD [1] , mais en raison de la complexité mathématique, peu d'applications ont pu être dégagées. En 1953, ROUSE [2] a élaboré une théorie plus simple dans laquelle la chaîne est divisée en sous-chaînes suffisamment longues pour que la distribution des distances bout à bout de chacune d'elles soit gaussienne, en première approximation. Une théorie analogue a été développée indépendamment par BUECHE [3]. Dans cette théorie, les sous-chaînes sont simplement représentées par des vecteurs et l'équation de diffusion traduit seulement le comportement statistique de ces vecteurs. Aussi ce modèle ne décrit-il de façon satisfaisante que les modes de relaxation les plus lents pour lesquels la structure détaillée de la chaîne n'intervient pas. Les applications sont donc limitées à l'étude de propriétés correspondant à des fréquences spatiales et temporelles grandes, telles que les propriétés viscoélastiques.

Diverses améliorations ont été apportées à ce modèle, permettant de tenir compte des interactions hydrodynamiques [4] des effets de volume exclu à longue distance [5, 6] ou introduisant la viscosité interne [7].

Quant au comportement à haute fréquence intervenant dans les expériences de résonance magnétique nucléaire, résonance paramagnétique électronique, relaxation diélectrique, polarisation de fluorescence...., la contribution des modes locaux est prédominante. C'est pourquoi une approche microscopique s'est avérée nécessaire et divers auteurs ont proposé des modèles stochastiques dans lesquels les mouvements de la chaîne résultent de mouvements locaux ou sauts se produisant de façon aléatoire le long de la chaîne. Le premier modèle a été présenté par VERDIER et STOCKMAYER [8] dans leur étude par une méthode de Monte-Carlo du mouvement d'une chaîne dans un réseau cubique simple. D'autres simulations ont été réalisées depuis avec ce modèle par VERDIER [9], et, dans le cas du réseau tétraédrique, par MONNERIE et GENY [10, 11].

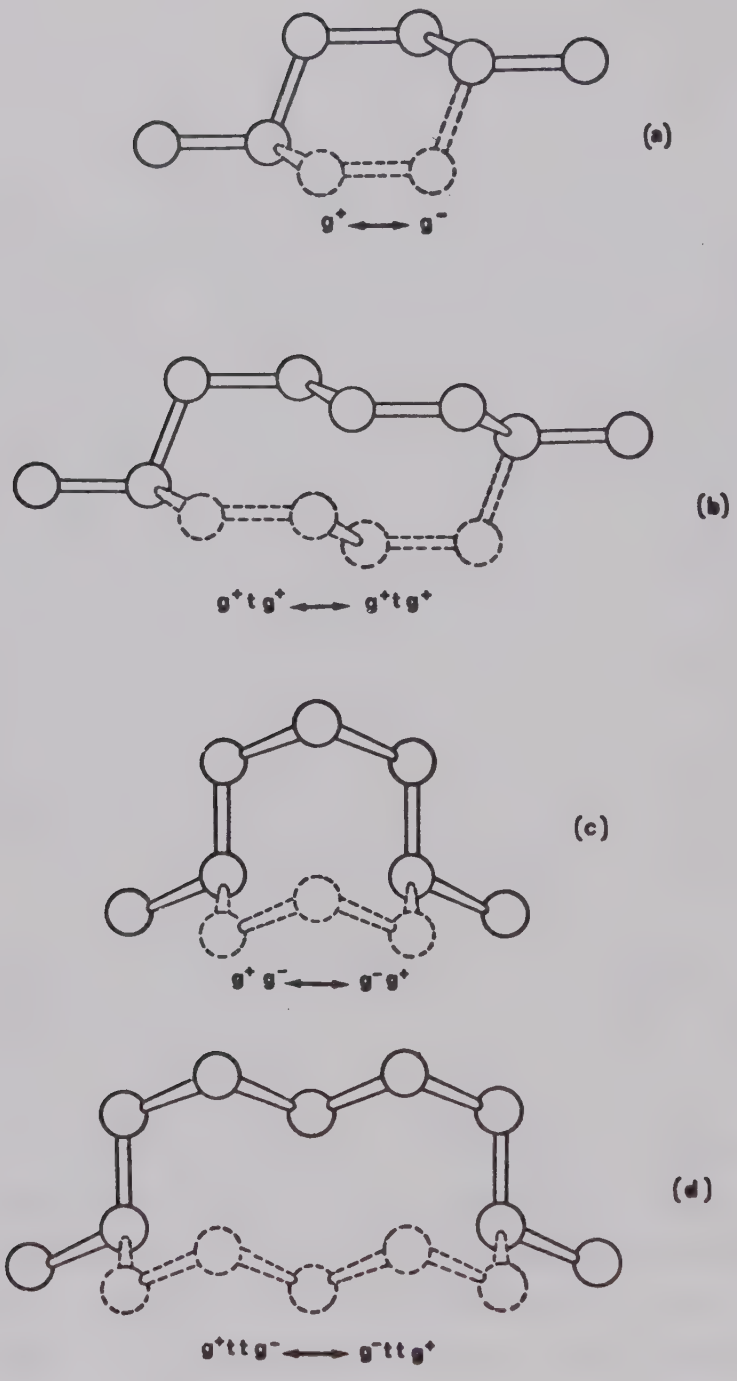


Fig. I-1 : Exemples de mouvements élémentaires :

(a) mouvement à trois liaisons

(b) "crankshaft" [17]

(c) mouvement à quatre liaisons

(d) mouvement à six liaisons proposé par PECHHOLD [18]

Du point de vue théorique, ORWOLL et STOCKMAYER [12] ont montré que, pour une chaîne à enchaînement libre, le spectre des temps de relaxation était identique à celui du modèle de ROUSE. Cependant, si des corrélations entre les directions des liaisons voisines sont ajoutées [12, 13] , la partie haute fréquence du spectre, qui doit refléter la nature des mouvements locaux, est différente.

De même, pour des modèles à sauts dans un réseau cubique [14] ou tétraédrique [15] , les théories montrent que les modes de relaxation lents sont identiques à ceux de ROUSE. Ce résultat a été généralisé par IWATA [16] .

Dans le but d'étudier le comportement haute fréquence des chaînes, une attention particulière doit être portée sur la nature des sauts.

Parmi les mouvements locaux qui peuvent être envisagés, il faut d'abord considérer ceux qui n'impliquent pas de translation des portions de chaîne adjacentes au groupe en mouvement. Ainsi, le mouvement à trois liaisons (fig. I-1(a)) apparaît comme le plus élémentaire. Le célèbre modèle du vilbrequin ("crankshaft") [17] fait intervenir cinq liaisons mais n'entraîne pas de déformation des angles de valence (fig. I-1(b)). Il faut aussi mentionner le mouvement à quatre liaisons décrit sur la figure I-1(c) et le mouvement proposé par PECHHOLD et coll. [18] mettant en jeu six liaisons (fig. I-1(d)).

Un autre type de mouvement, proposé par HELFAND [19], requiert une translation des portions de chaînes adjacentes. Grâce à des changements d'orientation induits dans celles-ci un tel mouvement n'apparaît pas du tout improbable [19].

Cette liste n'est évidemment pas exhaustive. Pour une chaîne inscrite dans un réseau tétraédrique, IWATA [20] a recensé à l'aide d'un ordinateur 2317 mouvements impliquant 14 liaisons. Il faut cependant remarquer, que la très grande majorité de ces mouvements peut se ramener à la succession de sauts à trois et/ou quatre liaisons.

Aussi est-il intéressant d'analyser le comportement d'une chaîne inscrite dans un réseau tétraédrique et soumise à des mouvements à trois et quatre liaisons. Avec ce modèle, DUBOIS-VIOLETTE, GENY, MONNERIE et PARODI [15] ont établi la fonction d'autocorrélation d'orientation d'une liaison interne de la chaîne :

$$M_2(t) = \frac{1}{2} < 3 \cos^2 \theta(t) - 1 > = \frac{1}{2\sqrt{\pi W t}}$$

où W est une fréquence microscopique de saut et $\theta(t)$ l'angle dont a tourné une liaison entre l'instant initial et l'instant t. Cette expression n'est valable qu'aux temps longs ($Wt \gg 1$).

Dans ce travail, nous avons repris ce modèle en tenant compte de la structure conformationnelle de la chaîne [21] .

I-1. DESCRIPTION DU MODELE.

La description complète du modèle est donnée dans les références 10 et 11. Nous en rappellerons les caractéristiques essentielles.

La chaîne macromoléculaire est construite dans un réseau tétraédrique du type diamant. Chaque atome du squelette de la chaîne est situé en un noeud du réseau et chaque liaison correspond à une arête. Les huit vecteurs caractérisant les orientations des arêtes peuvent être rassemblés en deux groupes $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}, \vec{d})$ et $(\vec{a}', \vec{b}', \vec{c}', \vec{d}')$ (figure I-2) tels que :

$$\vec{a}' = -\vec{a}$$
$$\vec{b}' = -\vec{b}$$
$$\vec{c}' = -\vec{c}$$
$$\vec{d}' = -\vec{d}$$

La succession de vecteurs permettant de construire la chaîne doit respecter la condition suivante : deux vecteurs successifs doivent appartenir à des groupes différents et ne doivent pas être opposés.

Il est possible de décrire le mouvement brownien de la chaîne par des déplacements élémentaires de petits groupes de chaînons en respectant la condition selon laquelle les liaisons coïncident toujours avec les arêtes du réseau. Cette condition implique qu'à l'intérieur de la chaîne, il est impossible d'effectuer des sauts mettant en jeu moins de trois chaînons. Dans un premier temps nous nous limiterons aux mouvements élémentaires à trois et quatre liaisons.

- mouvement à trois liaisons

Les atomes appartenant à une conformation trans (figure I-2, séquence 1-2-3-4) ne peuvent subir de mouvement. Par contre, il est possible de

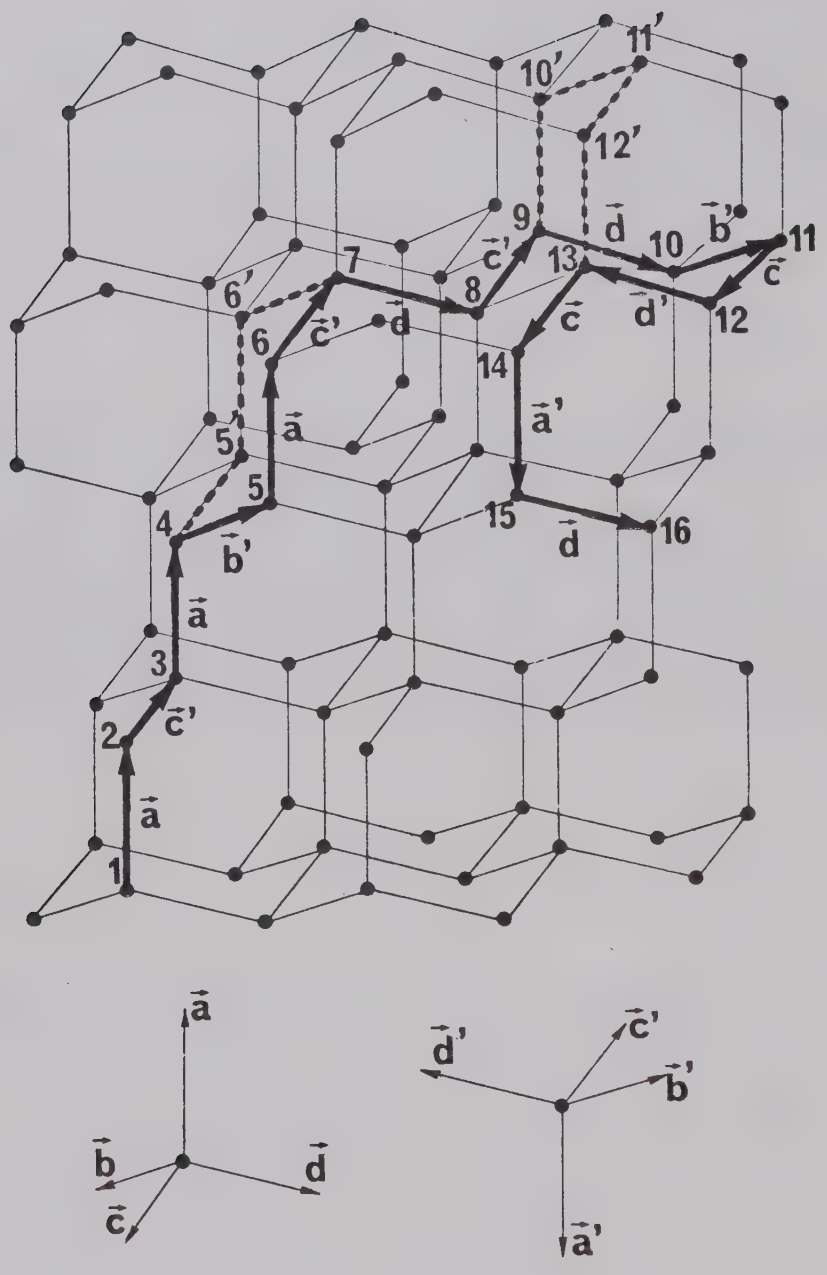


Fig. I-2 : Représentation d'une chaîne dans un réseau tétraédrique.

Exemple de :

- conformation trans (t) : séquence 1 - 2 - 3 - 4
- conformation gauche + (g^+) : séquence 4 - 5'- 6'- 7
- conformation gauche - (g^-) : séquence 4 - 5 - 6 - 7
- mouvement à trois liaisons :

  4 - 5 - 6 - 7 (g^-) $\leftrightarrow$ 4 - 5' - 6' - 7 (g^+)

- mouvement à quatre liaisons :

  9 - 10 - 11 - 12 - 13(g^+g^-)$\leftrightarrow$ 9 - 10' - 11' - 12' - 13(g^-g^+)

passer d'une conformation "gauche-" (g^-) à une conformation "gauche +" (g^+) ou réciproquement. Au cours d'un tel saut, les orientations des deux liaisons extrêmes s'échangent, mais la direction de la liaison centrale n'est pas modifiée : exemple (voir figure I-2) :

$\vec{b}'\ \vec{a}\ \vec{c}'$ $\leftrightarrow$ $\vec{c}'\ \vec{a}\ \vec{b}'$

(séquence 4-5-6-7) (séquences 4-5'-6'-7)

Il est important de remarquer qu'un mouvement à trois liaisons ne crée pas de nouvelles orientations mais qu'il permet de faire diffuser une orientation le long de la chaine [11].

- mouvement à quatre liaisons

Les processus à quatre liaisons peuvent se ramener à la succession de deux mouvements à trois liaisons sauf un qui correspond au passage d'une conformation $g^+\ g^-$ à une conformation $g^-\ g^+$ ou inversement. Exemple (voir figure I-2) :

$\vec{d}\ \vec{b}'\ \vec{c}\ \vec{d}'$ $\leftrightarrow$ $\vec{a}\ \vec{b}'\ \vec{c}\ \vec{a}'$

(séquence 9-10-11-12-13) (séquence 9-10'-11'-12'-13)

Au cours d'un tel saut, les orientations des deux liaisons internes ne sont pas modifiées, par contre il y a un changement d'orientation pour les liaisons extrêmes.

I-2. EQUATIONS GENERALES D'EVOLUTION.

I-2-1. Définitions.

Les deux fonctions d'autocorrélation qu'il est intéressant d'évaluer sont définies par les relations :

$$M_1(t) = \langle \vec{u}_n(o) \cdot \vec{u}_n(t) \rangle = \langle \cos\theta(t) \rangle$$

$$M_2(t) = \langle P_2[\vec{u}_n(o) \cdot \vec{u}_n(t)] \rangle = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta(t) - 1 \rangle \qquad (I\text{-}1)$$

où $\vec{u}_n$ est le vecteur unitaire porté par la $n^{ième}$ liaison et $\theta(t)$ l'angle dont a tourné celle-ci entre l'instant $t = 0$ et l'instant t. P_2 est le polynôme de Legendre d'ordre 2.

Il est à noter que dans le modèle du réseau diamant, ces deux fonctions d'autocorrélation sont égales [15].

D'une façon plus générale, la fonction de corrélation d'orientation cherchée est définie par la relation :

$$Q_{nm}(t) = \langle P_2[\vec{u}_n(o) \cdot \vec{u}_m(t)] \rangle \qquad (I\text{-}2)$$

Cette expression étant invariante par le changement de $\vec{u}_n$ en $-\vec{u}_n$, il suffit de considérer les directions des liaisons, à savoir a, b, c et d.

Soit $P_i^n(t)$ la probabilité à l'instant t pour que la $n^{ième}$ liaison soit dirigée suivant i (i = a, b, c ou d); la fonction de corrélation s'écrit alors :

$$Q_{nm}(t) = \frac{1}{2}\left[3 \sum_i \sum_j P_i^n(o)\, P_j^m(t)\, (\vec{i} \cdot \vec{j})^2 - 1\right] \qquad (I\text{-}3)$$

$\vec{i}$ et $\vec{j}$ étant les vecteurs unitaires portés par les directions i et j. La condition de normalisation est :

$$\sum_i P_i^n(t) = 1$$

Dans le cas considéré des chaînes isotropes, on supposera qu'à l'instant t = 0 la liaison n_o est dirigée suivant a, c'est à dire :

$$P_a^{n_o}(o) = 1$$

L'équation (I-3) devient alors :

$$Q_{nn_o}(t) = \frac{1}{2}\left[3 \sum_j P_j^n(t) (\vec{a} \cdot \vec{j})^2 - 1\right]$$

En tenant compte des angles du réseau tétraédrique, les fonctions de corrélation et d'autocorrélation s'écrivent :

$$Q_{nn_o}(t) = \frac{4}{3}\left[P_a^n(t) - \frac{1}{4}\right] \qquad \text{(I-4)}$$

$$M_2(t) = Q_{nn_o}(t) = \frac{4}{3}\left[P_a^{n_o}(t) - \frac{1}{4}\right] \qquad \text{(I-5)}$$

I-2-2. Expression générale de la fonction de corrélation d'orientation.

Le calcul sera effectué pour une chaîne **infinie.**

La variation de P_a^n entre l'instant t et l'instant t + dt, s'obtient en dénombrant les mouvements à trois et quatre liaisons susceptibles de faire apparaître ou disparaître l'orientation a en n, ce qui conduit [15] à l'expression :

$$\frac{\partial P_a^n}{\partial t} = W_3 \left[\sum_{i,j,k,\ell \neq a} (P^{n-1}_{\ell jiak} - P^{n-1}_{\ell aijk}) + \sum_{i,j,k,\ell \neq a} (P^{n-3}_{kaij\ell} - P^{n-3}_{kjia\ell}) \right]$$

$$+ W_4 \left[\sum_{i,j,k,\ell,p\neq a} (P^{n-1}_{\ell pijpk} - P^{n-1}_{\ell aijak}) + \sum_{i,j,k,\ell,p\neq a} (P^{n-4}_{\ell pijpk} - P^{n-4}_{\ell aijak}) \right] \qquad \text{(I-6)}$$

où W_3 et W_4 sont les fréquences des mouvements à trois et quatre liaisons respectivement, et où le symbole $P^n_{i,j,k,\ldots}$ représente la probabilité pour que les liaisons n, n+1, n+2,.... aient respectivement les orientations i, j, k,....

Cette relation tient compte de l'exclusion de volume appliquée aux liaisons adjacentes au groupe en mouvement (effet de back-step) aussi bien pour les mouvements à trois liaisons que pour ceux à quatre. L'évaluation des termes de la relation (I-6) sous une forme simple n'est seulement possible qu'au prix d'une hypothèse de linéarisation, ce qui conduit [15] à l'équation suivante, valable seulement aux temps longs :

$$\frac{\partial \varepsilon_a^n}{\partial t} = -\frac{4W_3}{3^4}\left[10(2\,\varepsilon_a^n - \varepsilon_a^{n+2} - \varepsilon_a^{n-2}) + 3(\varepsilon_a^{n+1} + \varepsilon_a^{n-1} - \varepsilon_a^{n+3} - \varepsilon_a^{n-3})\right]$$

$$-\frac{8W_4}{3^5}\left[73(2\,\varepsilon_a^n + \varepsilon_a^{n+3} + \varepsilon_a^{n-3}) - 15(\varepsilon_a^{n+4} + \varepsilon_a^{n-4})\right.$$

$$\left. -37(\varepsilon_a^{n+1} + \varepsilon_a^{n-1}) - 22(\varepsilon_a^{n+2} + \varepsilon_a^{n-2})\right] \qquad \text{(I-7)}$$

avec $\varepsilon_a^n = P_a^n - \frac{1}{4}$

L'analyse de ε_a^n en modes propres $e^{ikn}\, e^{-t/\tau(k)}$ donne :

$$\frac{1}{\tau(k)} = \frac{8}{3^4} W_3 \left[20 \sin^2 k + 3(\cos k - \cos 3k)\right]$$

$$+ \frac{16}{3^5} W_4 \left[73(1 + \cos 3k) - 15 \cos 4k - 37 \cos k - 22 \cos 2k\right] \qquad \text{(I-8)}$$

D'autre part, la condition initiale selon laquelle la liaison n_o est dirigée suivant a à l'instant t = 0, implique entre les orientations des liaisons autour de la liaison n_o, une corrélation initiale $\phi(|n - n_o|)$.

La fonction de corrélation à l'instant t peut se mettre sous la forme suivante, en posant $m = n - n_o$

$$Q_m(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{+\pi} e^{ikm}\, g(k)\, e^{-t/\tau(k)}\, dk \qquad (I\text{-}9)$$

où

$$g(k) = \sum_{-\infty}^{+\infty} e^{-ikm}\, \phi(|m|)$$

Aux temps longs, il y a prédominance des modes lents, c'est-à-dire des modes qui correspondent à $1/\tau(k)$ voisin de 0. Or d'après la relation (I-8), $1/\tau(k)$ ne peut tendre vers 0 que lorsque k tend vers π. Un développement autour de $k = \pi$ conduit à :

$$\frac{1}{\tau(k)} \sim (3{,}16\, W_3 + 9{,}61\, W_4)k^2$$

Si, dans un premier temps, la fonction de corrélation initiale est assimilée à une fonction de DIRAC [15], la fonction d'autocorrélation prend, aux temps longs, la forme

$$M_2(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{+\pi} e^{-A k^2 t}\, dk \simeq \frac{1}{2\sqrt{\pi A t}} \qquad (I\text{-}10)$$

avec $A = 3{,}16\, W_3 + 9{,}61\, W_4$.

Nous allons maintenant examiner la forme réelle de la fonction de corrélation initiale.

I-2-3. Fonction de corrélation initiale.

Pour les chaînes dans lesquelles les conformations trans, gauche +, gauche - sont équiprobables ($P_t = P_{g+} = P_{g-} = \frac{1}{3}$), il est aisé de montrer que la corrélation initiale est :

$$\phi(|m|) = (-\frac{1}{3})^{|m|} \qquad (I\text{-}1.1)$$

Dans le cas des chaînes à empêchement de rotation interne symétrique ($P_{g+} = P_{g-} = P_g$), $\phi(|m|)$ peut être obtenue à partir de la description des conformations d'une chaîne à l'aide de processus de Markov. En utilisant le modèle et les calculs de KINSINGER [23], on peut établir la moyenne du cosinus de l'angle que font entre eux les vecteurs unitaires portés par les liaisons 0 et m (m est supposé > 0 pour simplifier les notations) :

$$< \cos \theta_{om} > = \frac{1}{3} (4\, S_{11}^{(m)} - 1)\, (-1)^m$$

où $S_{11}^{(m)}$ est le premier élément de la matrice S élevée à la puissance m, l'expression de S étant :

$$S = \begin{matrix} 0 & \beta & \beta & \alpha \\ 0 & \beta & \alpha & \beta \\ 0 & \alpha & \beta & \beta \\ 1 & 0 & 0 & 0 \end{matrix}$$

avec $\alpha = P_t$ et $\beta = P_g$, $(\alpha + 2\,\beta = 1)$.

Pour calculer $S_{11}^{(m)}$, il faut diagonaliser la matrice S dont les valeurs propres sont :

$$\lambda_1 = 1 \quad \lambda_2 = 3\,\beta - 1 \quad \lambda_3 = \frac{-\beta + \sqrt{\Delta}}{2} \quad \lambda_4 = \frac{-\beta - \sqrt{\Delta}}{2}$$

où $\Delta = \beta^2 - 12\,\beta + 4$.

Avec ces valeurs, la matrice S élevée à la puissance m peut s'écrire sous la forme :

$$S^m = B \begin{pmatrix} \lambda_1^m & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2^m & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3^m & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \lambda_4^m \end{pmatrix} B^{-1}$$

B étant la matrice de passage :

$$B = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \lambda_3 & \lambda_4 \\ 1 & 1 & \mu_3 & \mu_4 \\ 1 & -1 & \mu_3 & \mu_4 \\ 1 & 0 & 1 & 1 \end{pmatrix}$$

avec $$\mu_3 = - \frac{\beta}{1 - \beta - \lambda_3}$$

$$\mu_4 = - \frac{\beta}{1 - \beta - \lambda_4}$$

Il en résulte :

$$S_{11}^{(m)} = \frac{1}{4} + \frac{3}{4} \frac{(\lambda_4 + \beta - \frac{1}{3}) \lambda_4^m - (\lambda_3 + \beta - \frac{1}{3}) \lambda_3^m}{\lambda_4 - \lambda_3}$$

d'où :

$$\phi(m) = A \lambda_3^m + (1 - A) \lambda_4^m \qquad \text{(I-12)}$$

avec :

$$A = \frac{1}{2\sqrt{\Delta}} \left(\beta + \sqrt{\Delta} - \frac{2}{3}\right)$$

- Si $\beta > 0{,}344$, λ_3 et λ_4 sont complexes conjugués et $\phi(m)$ est de la forme:

$$\phi(m) = r\,\rho^m \cos(m\,\theta - \varphi) \qquad \text{(I-13)}$$

- Si $\beta < 0{,}344$, λ_3 et λ_4 sont réels

$$\frac{1}{3} < \beta < 0{,}344 : \lambda_3 \text{ et } \lambda_4 < 0$$

$$\beta < \frac{1}{3} \quad : \lambda_3 > 0 \text{ et } \lambda_4 < 0$$

I-3. EXPRESSIONS ANALYTIQUES DES FONCTIONS DE CORRELATION ET D'AUTOCORRELATION POUR UNE CHAINE SOUMISE A DES MOUVEMENTS A TROIS LIAISONS.

Dans ce chapitre seuls les mouvements à trois liaisons seront considérés, car dans ce cas il est particulièrement simple d'obtenir des expressions analytiques.

Il faut d'ailleurs remarquer que les conformations $g^{+}_{-}\ g^{-}_{+}$ susceptibles de donner lieu à des mouvements à quatre liaisons sont souvent très défavorisées et même interdites dans les polymères à squelette carboné.

Lorsque seuls les mouvements à trois liaisons sont pris en considération, les calculs suivants vont montrer que l'hypothèse de linéarisation n'est pas nécessaire dans la mesure où l'on ne tient pas compte de l'effet de back-step. Or, il est raisonnable de penser que les lois d'évolution de la chaîne sont peu modifiées par cet effet et qu'il affecte seulement la fréquence des sauts.

L'équation (I-6) devient alors :

$$\frac{\partial P_a^n}{\partial t} = W \left[\sum_{i,j\neq a} (P^n_{jia} - P^n_{aij}) + \sum_{i,j\neq a} (P^{n-2}_{aij} - P^{n-2}_{jia}) \right]$$

or

$$\sum_{i,j\neq a} P^n_{aij} = P^n_a - \sum_i P^n_{aia}$$

$$\sum_{i,j\neq a} P^n_{jia} = P^{n+2}_a - \sum_i P^n_{aia}$$

Les termes de la deuxième somme s'évaluent de façon analogue, et finalement, l'équation différentielle s'écrit :

$$\frac{\partial P_a^n}{\partial t} = - W(2\ P^n_a - P^{n+2}_a - P^{n-2}_a) \qquad \text{(I-14)}$$

Du fait de l'absence d'hypothèse de linéarisation, cette expression reste valable aux temps courts. Il est à noter qu'il suffit de considérer les liaisons de même parité. Ainsi, en posant $n - n_o = 2p$, la fonction de corrélation est solution de l'équation :

$$\frac{\partial Q_p}{\partial t} = - W (2 Q_p - Q_{p+1} - Q_{p-1})$$

Pour obtenir une expression analytique de Q_p, il est plus commode d'assimiler les variations discontinues de Q_p en fonction de p, à des variations continues, ce qui s'exprime par l'équation de diffusion :

$$\frac{\partial Q_p}{\partial t} = W \frac{\partial^2 Q_p}{\partial p^2} \qquad \text{(I-15)}$$

La validité d'une telle équation est évidemment mise en cause à des temps très courts.

La réponse impulsionnelle du phénomène régi par l'équation (I-15) est la fonction de Green suivante :

$$G(p,t|0,0) = \frac{1}{2\sqrt{\pi Wt}} \exp\left(- \frac{p^2}{4Wt}\right)$$

La fonction de corrélation s'obtient en effectuant la convolution de G par la fonction de corrélation initiale :

$$Q_p(t) = \frac{1}{2\sqrt{\pi Wt}} \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left[- \frac{\mu^2}{4Wt}\right] \phi(|p - \mu|) d\mu \qquad \text{(I-16)}$$

Etudions d'abord le cas particulier où les trois conformations trans, gauche +, gauche - sont équiprobables. Dans ce cas, $\phi(|p|)$ peut s'écrire, d'après la relation (I-11) :

$$\phi(|p|) = \left(\frac{1}{9}\right)^{|p|}$$

En mettant cette expression sous la forme $e^{-\gamma|p|}$, l'intégrale de convolution de l'équation (I-16), se calcule aisément à l'aide des transformées de Fourier et conduit à l'expression :

$$Q_p(t) = \frac{1}{2} e^{\gamma^2 Wt} \left[e^{-\gamma|p|} \operatorname{erfc}\left(\sqrt{\gamma^2 Wt} - \frac{1}{2} \frac{|p|}{\sqrt{Wt}}\right) + e^{+\gamma|p|} \operatorname{erfc}\left(\sqrt{\gamma^2 Wt} + \frac{1}{2} \frac{|p|}{\sqrt{Wt}}\right)\right] \qquad \text{(I-17)}$$

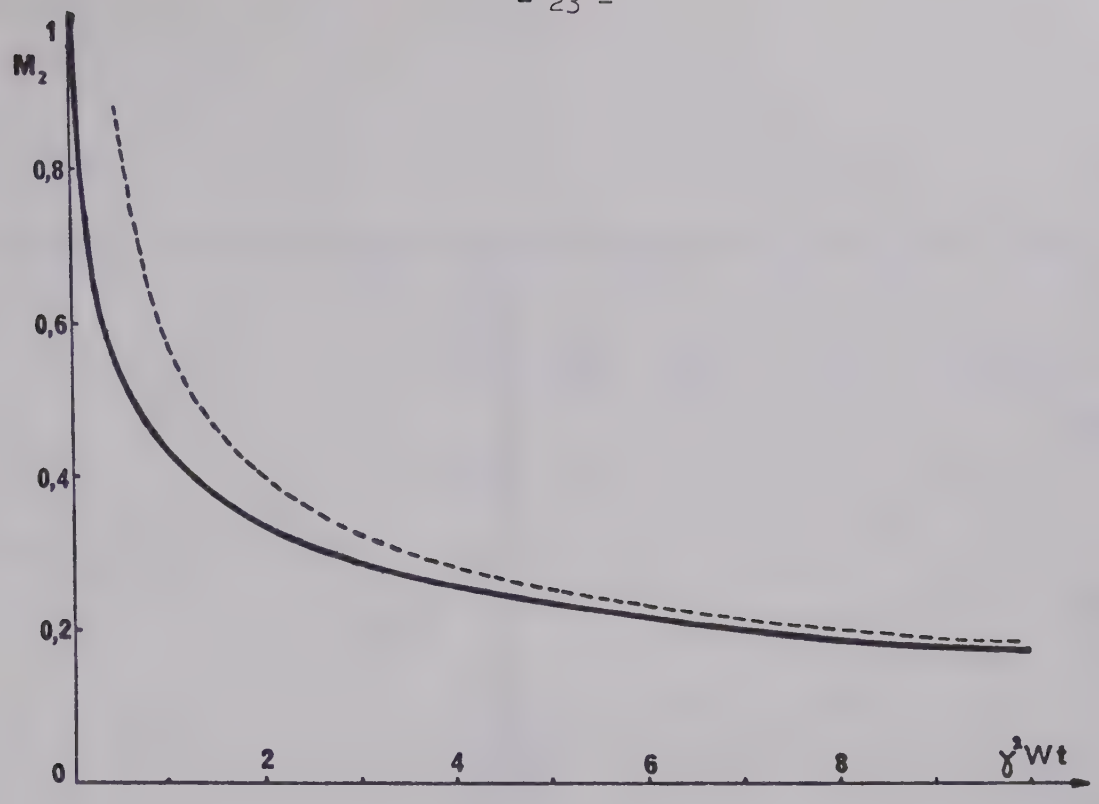


Fig. I-3 : Fonctions d'autocorrélation

—— fonction $M_2(t) = e^{\gamma^2 Wt}\ \text{erfc}\ \sqrt{\gamma^2 Wt}$

---- fonction $M_2(t) = \dfrac{1}{\sqrt{\pi\gamma^2 Wt}}$

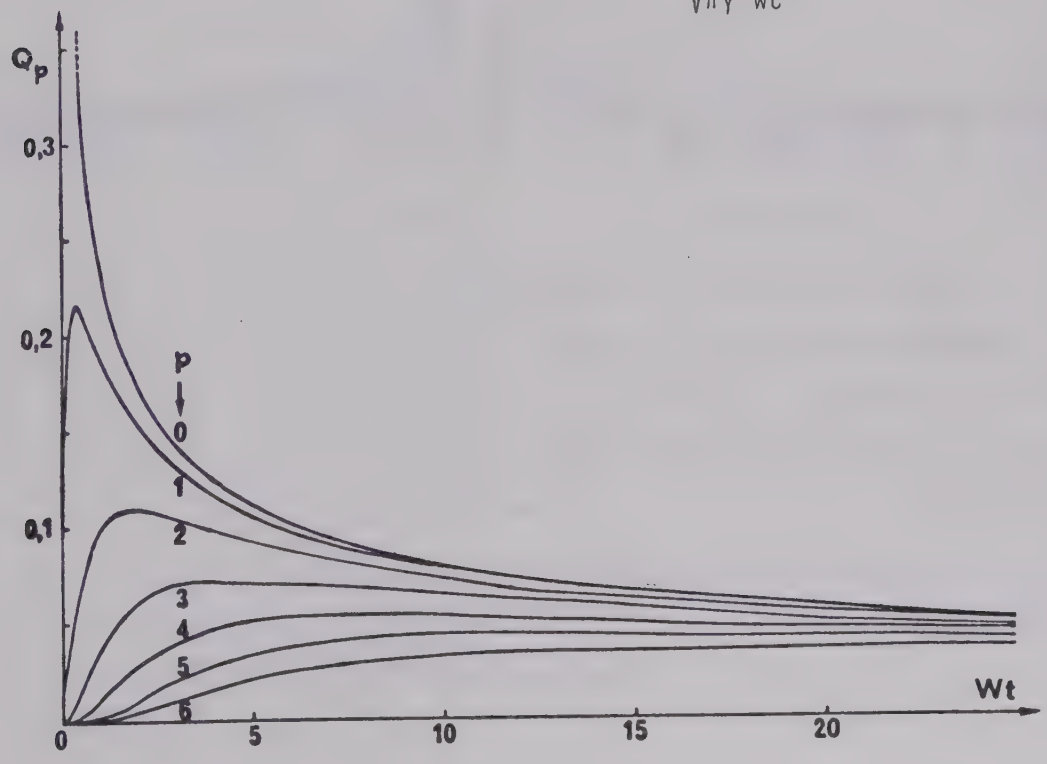


Fig. I-4 : Fonctions d'autocorrélation et de corrélation dans le cas $P_t = P_g$ (γ = Log 9) tracées en fonction du temps pour diverses valeurs de p.

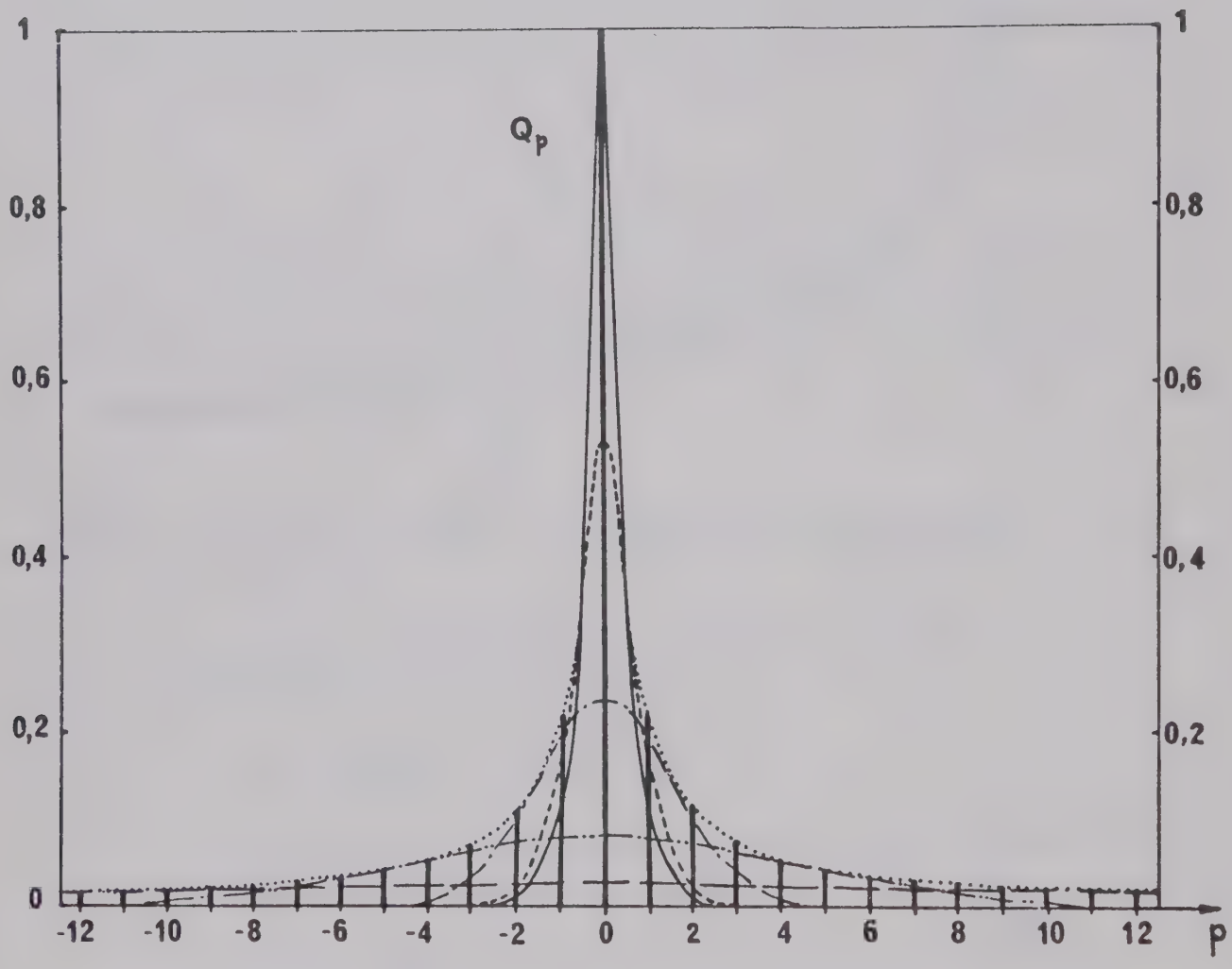


Fig. I-5 : Fonctions de corrélation dans le cas $P_t = P_g$ (γ = Log 9) tracées en fonction de p à divers instants

———— t = 0

- - - - - - - - t = $W^{-1}/10$

——— . ——— t = W^{-1}

——— . . ——— t = 10 W^{-1}

——— ——— ——— t =100 W^{-1}

..... lieu des maximum

dans laquelle erfc est la fonction complémentaire de la fonction erreur :

$$\text{erfc}(x) = 1 - \text{erf}(x) = 1 - \int_0^x e^{-u^2} du$$

La fonction d'autocorrélation se déduit de $Q_p(t)$ en faisant $p = 0$.

$$M_2(t) = e^{\gamma^2 Wt} \text{ erfc } \sqrt{\gamma^2 Wt} \qquad \text{(I-18)}$$

expression qui redonne bien, aux temps longs, une loi en $t^{-\frac{1}{2}}$:

$$M_2(t) \simeq \frac{1}{\sqrt{\pi \gamma^2 Wt}} \qquad \text{(I-19)}$$

Sur la figure I-3, les fonctions d'autocorrélation relatives aux expressions (I-18) et (I-19) ont été tracées. D'autre part les fonctions de corrélation sont représentées sur les figures I-4 et I-5, soit en fonction du temps, soit en fonction du numéro du chaînon.

Dans le cas des chaînes à empêchement de rotation interne symétrique pour lesquelles $Pg < 0{,}344$, la fonction de corrélation initiale s'écrit, en ne prenant que les termes pairs :

$$\phi(|p|) = A(\lambda_3^2)^{|p|} + (1 - A)(\lambda_4^2)^{|p|}$$

relation qui peut se mettre sous la forme :

$$\phi(|p|) = A\, e^{-\gamma_1 |p|} + (1 - A)\, e^{-\gamma_2 |p|}$$

La fonction d'autocorrélation s'écrit alors, en toute rigueur :

$$M_2(t) = A\, e^{\gamma_1^2 Wt} \text{ erfc } \sqrt{\gamma_1^2 Wt} + (1 - A)\, e^{\gamma_2^2 Wt} \text{ erfc } \sqrt{\gamma_2^2 Wt}$$

Néanmoins, en attribuant diverses valeurs à $Pg(<0{,}344)$, on constate que les valeurs correspondantes de $\phi(|p|)$ sont en première approximation voisines de celles que l'on obtiendrait à partir d'une loi du type :

$$\phi(|p|) = e^{-\gamma |p|} \qquad \text{(I-20)}$$

avec γ convenablement choisi, chaque type de chaîne étant caractérisé par une valeur du paramètre γ. Dans le cas considéré $Pg < 0{,}344$, les expressions (I-17) et (I-18) restent alors valables.

Si l'on pose $\rho = 1/\gamma^2 W$, la fonction d'autocorrélation s'écrit :

$$M_2(t) = e^{t/\rho} \operatorname{erfc} \sqrt{\frac{t}{\rho}} \qquad \text{(I-21)}$$

ce qui est précisément le résultat obtenu par HUNT et POWLES [24] pour le modèle unidimensionnel de diffusion de défauts proposé par GLARUM [25] .

En conclusion, la relation (I-18) exprime que la relaxation de la chaîne dépend non seulement de la fréquence des sauts, mais aussi de la corrélation initiale des orientations des liaisons. Il est ainsi possible de relier la structure de la chaîne à son comportement dynamique. Aussi peut-on réellement parler d'une mémoire conformationnelle caractérisée par $1/\gamma$.

I-4. APPLICATIONS A L'ETUDE DU COMPORTEMENT DYNAMIQUE DES CHAINES.

Dans ce chapitre, nous n'envisagerons que le cas de chaînes soumises à des mouvements à trois liaisons. Les résultats peuvent être généralisés de façon très simple au cas où interviennent seulement des mouvements entraînant une diffusion d'orientation le long de la chaîne.

I-4-1. Notion d'unité cinétique indépendante.

On appelle unité cinétique indépendante la plus courte sous-chaîne telle que le mouvement de la liaison centrale soit indépendant du mouvement des liaisons extérieures à cette sous-chaîne.

Ainsi, dans le cas considéré de phénomènes liés à l'orientation des liaisons, une perturbation appliquée à la liaison n se propage en modifiant le comportement des liaisons successives. Cette propagation s'accompagne d'un amortissement (figure I-5), de sorte qu'au bout d'un certain temps, au-delà d'une certaine distance le long de la chaîne, l'effet de la perturbation sur le comportement d'une certaine liaison n_o peut être considéré comme négligeable. Cette liaison n_o peut donc jouer le rôle de la liaison centrale de l'unité cinétique indépendante dont la longueur correspondant à deux fois l'intervalle $|n - n_o|$ dépend en outre de la durée considérée pour la propagation de la perturbation, de la fréquence des sauts élémentaires W et de la mémoire conformationnelle $\frac{1}{\gamma}$ de la chaîne.

Expérimentalement, l'effet de la perturbation est considéré comme négligeable lorsqu'il est du même ordre de grandeur que l'erreur absolue sur la mesure du comportement d'une liaison.

L'influence de la durée de propagation sur l'effet de la perturbation est illustrée sur les courbes de la figure I-5. Or, comme à chaque technique correspond un temps d'observation caractéristique, l'unité

cinétique indépendante ainsi définie dépendra de la technique utilisée.

I-4-2. Distribution des temps de relaxation.

En toute rigueur, la résolution du système différentiel constitué par les équations du type(I-14) conduirait pour la fonction d'autocorrélation à une superposition de contributions exponentielles provenant des différents modes de relaxation de la chaîne. Chacun de ces modes est caractérisé par sa constante de temps σ_i et son amplitude A_i :

$$M_2(t) = \sum_i A_i \, e^{-t/\sigma_i}$$

La variation de A_i en fonction de σ_i traduit la distribution des temps de relaxation.

Afin d'obtenir une expression analytique, cette distribution sera assimilée à une fonction continue $G(\sigma)$:

$$M_2(t) = \int_o^\infty G(\sigma) \, e^{-t/\sigma} \, d\sigma$$

avec :

$$\int_o^\infty G(\sigma) \, d\sigma = 1$$

En utilisant pour $M_2(t)$ l'expression (I-18), $G(\sigma)$ calculée par inversion de Laplace, s'écrit :

$$G(\sigma) = \frac{\sqrt{\gamma^2 W\sigma}}{\pi \, \sigma(1 + \gamma^2 W\sigma)}$$

Cette loi de distribution ne présente pas de maximum, mais fait apparaître une contribution croissante des temps de relaxation courts.

I-4-3. Influence du bout de la chaîne.

Dans ce qui précède, nous avons supposé que la chaîne était infinie. Il est intéressant maintenant de préciser l'influence du bout de la chaîne sur la fonction d'autocorrélation. Si l'extrémité de la chaîne

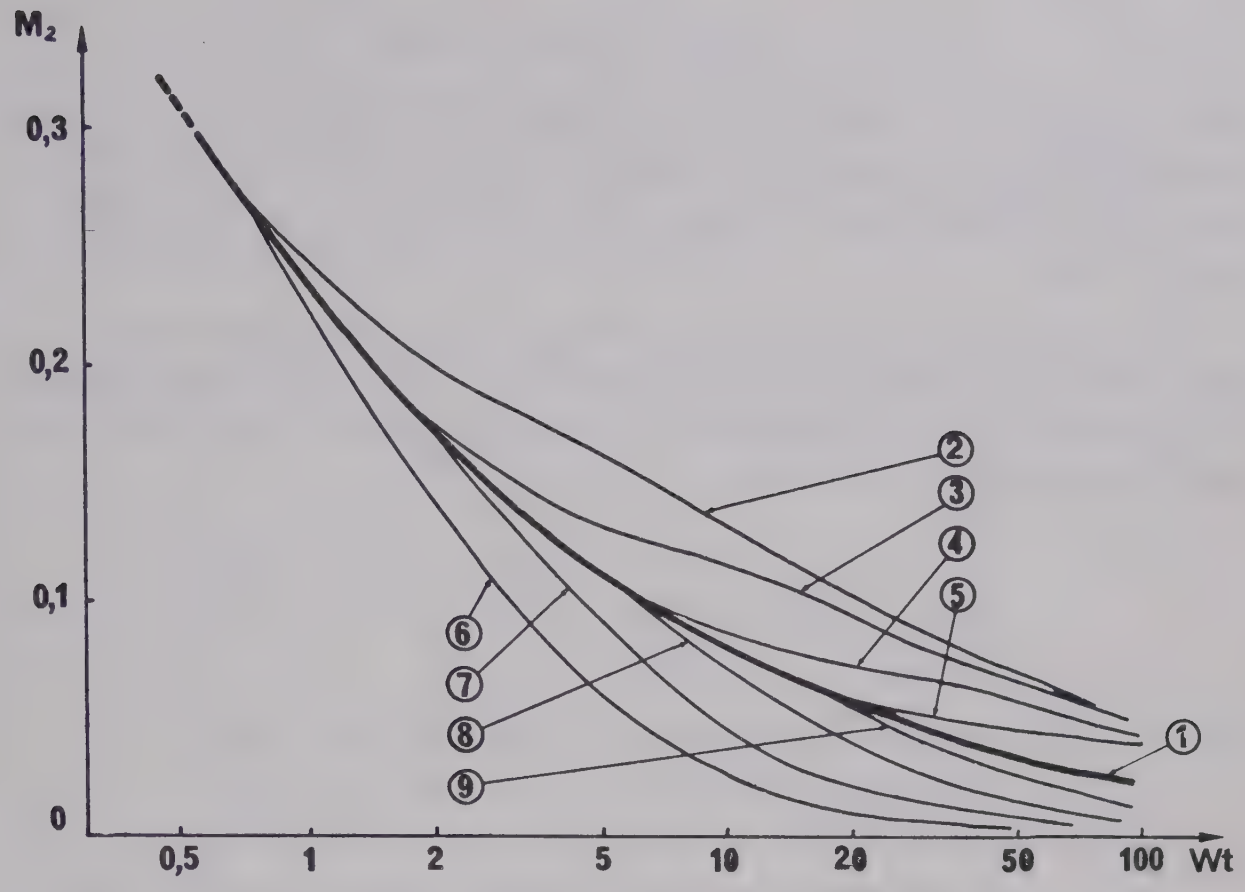


Fig. I-6 : Influence de l'extrémité de la chaîne sur la fonction d'autocorrélation dans le cas $P_t = P_g$.

Courbe 1 : fonction d'autocorrélation d'orientation d'une liaison dans une chaîne infinie.

Courbe 2 : $n_o = 4$
" 3 : $n_o = 6$
" 4 : $n_o = 10$
" 5 : $n_o = 16$
$\alpha = 1$ (extrémité fixe)

Courbe 6 : $n_o = 4$
" 7 : $n_o = 6$
" 8 : $n_o = 10$
" 9 : $n_o = 16$
$\alpha = -1$ (extrémité libre)

(n_o : nombre de liaisons séparant la liaison considérée et l'extrémité de la chaîne).

est libre, $M_2(t)$ doit décroître plus rapidement car le mouvement de la liaison terminale introduit une perte d'orientation. Par contre si l'extrémité est fixe, il n'y a aucune perte d'orientation et la décroissance de $M_2(t)$ doit être plus lente.

Ce problème peut être résolu à l'aide de la théorie des images [27]. La condition initiale étanttoujours $P_a^{n_o} = 1$ et la liaison terminale correspondant à $n' = 0$, la fonction de Green peut se mettre, dans le cas d'une chaîne semi-infinie, sous la forme :

$$G(n, t|n_o, 0) = \frac{1}{2\sqrt{\pi Wt}} \left[e^{-\frac{(n-n_o)^2}{4Wt}} + \alpha\, e^{-\frac{(n+n_o)^2}{4Wt}} \right]$$

où : $\alpha = 1$ si l'extrémité de la chaîne est fixée (réflexion totale)
$-1 \leqslant \alpha < 0$ si elle est libre (le cas $\alpha = -1$ correspond à une perte totale d'orientation au niveau de la liaison terminale).

En supposant pour simplifier que la liaison n_o considérée est située suffisamment loin pour que la corrélation initiale soit négligeable à l'extrémité de la chaîne, la fonction d'autocorrélation en n_o s'écrit :

$$M_2^{*}(t) = M_2(t) + \frac{1}{2}\alpha\, e^{\gamma^2 Wt} \left[e^{-\gamma n_o} \operatorname{erfc}\left(\sqrt{\gamma^2 Wt} - \frac{1}{2}\frac{n_o}{\sqrt{Wt}}\right) + e^{\gamma n_o} \operatorname{erfc}\left(\sqrt{\gamma^2 Wt} + \frac{1}{2}\frac{n_o}{\sqrt{Wt}}\right) \right]$$

$$= M_2(t) + \alpha Q_{n_o}(t)$$

Sur la figure I-6 cette fonction a été tracée dans le cas $P_t = P_g$ ($\gamma = \text{Log } 9$) pour diverses valeurs de n_o et pour $\alpha = +1$ et -1. Les courbes montrent que l'effet de l'extrémité de la chaîne s'atténue très rapidement.

I-4-4. Cas des polymères réticulés.

De la même façon il est possible de traiter le cas des chaînes ayant leurs extrémités fixes. Il suffit de tenir compte des "réflexions" multiples aux extrémités de la chaîne. La fonction d'autocorrélation de la liaison centrale n_o s'écrit alors :

$$M_2^{\star}(t) = M_2(t) + 2[Q_{n_o}(t) + Q_{2n_o}(t) + Q_{3n_o}(t) + ...]$$

I-5 COMPORTEMENT D'UNE CHAINE HORS RESEAU.

Dans tout ce qui précède, la chaîne était astreinte à évoluer strictement dans un réseau tétraédrique. Mais dans la réalité, des écarts par rapport à un tel comportement peuvent provenir des causes suivantes, comme DUBOIS-VIOLETTE [15] l'a signalé :

- Les angles de valence de la chaîne peuvent être notablement différents de 109°28'
- Les angles de rotation interne sur le cône de valence peuvent s'écarter sensiblement de 120°
- En raison de l'agitation thermique, il existe une incertitude quadratique moyenne sur l'angle de rotation interne.

Dans ces conditions, il n'y a plus identité entre $< \cos \theta >$ et $\frac{1}{2} < 3 \cos^2 \theta - 1 >$, et l'on peut prévoir [15] une contribution exponentielle des écarts mentionnés ci-dessus.

Il faut mentionner aussi les mouvements faisant intervenir un plus grand nombre de liaisons que les mouvements élémentaires précédemment décrits. Pour refléter l'effet de ces mouvements à plus grande échelle, WEILL et HERMANN [98] ont ajouté un mouvement de diffusion de rotation du réseau dont la contribution sera également exponentielle.

La fonction d'autocorrélation d'orientation prend finalement la forme suivante :

$$M_2(t) = e^{-t/\theta} \; e^{t/\rho} \; \operatorname{erfc} \sqrt{\frac{t}{\rho}} \qquad \text{(I-23)}$$

dont le comportement aux temps longs sera en $t^{-1/2} \exp(-t/\theta)$

Afin de tester la validité de cette théorie, nous nous proposons maintenant d'étudier expérimentalement le comportement dynamique d'une chaîne de polystyrène par la technique de polarisation de fluorescence. Auparavant, les appareils et méthodes nécessaires à cette étude vont être décrits.

Deuxième partie

THEORIES ET MESURES DE L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

Lorsqu'une molécule fluorescente reçoit une radiation de longueur d'onde convenable qui la fait passer de l'état fondamental à un état excité, elle se comporte comme un oscillateur dipolaire électrique, appelé "moment de transition d'absorption". L'émission de la fluorescence, correspondant au retour à l'état fondamental,est caractérisée de la même façon par le moment de transition d'émission de la molécule.

En l'absence de champ ou contrainte extérieure, la distribution des moments de transition d'absorption des molécules est uniforme dans la solution. Par contre, les molécules à l'état excité ne présentent plus une distribution uniforme de leurs moments de transition d'émission. En effet, la probabilité d'excitation varie avec le carré du cosinus de l'angle entre la direction du moment de transition d'excitation et celle du vecteur électrique de l'onde excitatrice. Tout phénomène susceptible de modifier la direction du moment de transition d'émission, provoquera une dépolarisation de la fluorescence.

Avant d'examiner ces phénomènes, il faut préciser que pour caractériser la polarisation de la fluorescence, deux grandeurs sont généralement utilisées : le taux de polarisation p et l'anisotropie d'émission r, définis par les relations :

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I}$$

où $I_{\parallel}$ et $I_{\perp}$ sont les composantes respectivement parallèle et perpendiculaire au vecteur électrique de l'onde incidente (figure II-1) . I est l'intensité totale de la lumière émise. La relation qui lie r et p est la suivante

$$r = \frac{2\,p}{3 - p}$$

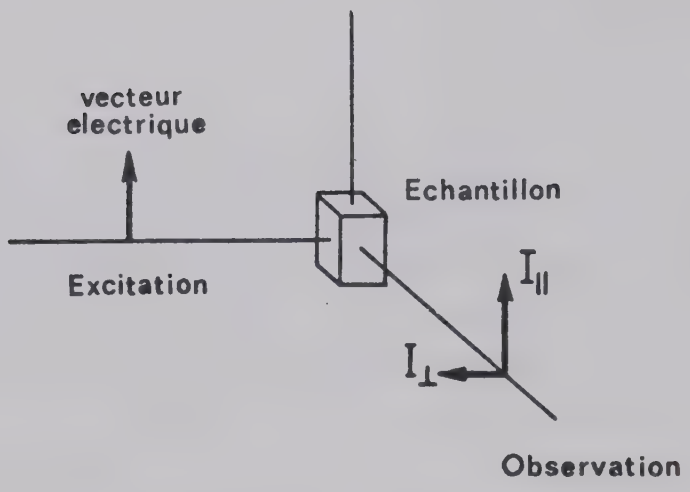


Fig. II-1.

Lorsque la lumière excitatrice est naturelle, la fluorescence émise est partiellement polarisée. Pour une observation à 90° de la direction de la lumière incidente, le taux de polarisation p_n et l'anistropie r_n sont liés aux précédents par les relations

$$r_n = \frac{r}{2}$$

$$p_n = \frac{p}{2 - p}$$

De plus :

$$r_n = \frac{2p_n}{3 + p_n}$$

Bien que de nombreux auteurs emploient le taux de polarisation, l'utilisation de l'anisotropie d'émission, introduite par JABLONSKI [28] simplifie les formulations théoriques. C'est pourquoi seule cette grandeur sera utilisée dans la suite de ce travail.

En l'absence de toute cause extérieure de dépolarisation de la fluorescence, PERRIN [29] a montré que l'anisotropie d'émission fondamentale avait pour expression :

$$r_o = \frac{2}{5}\left(\frac{3\cos^2\alpha - 1}{2}\right)$$

où α désigne l'angle entre les directions des oscillateurs d'absorption et d'émission supposés linéaires. Il en résulte pour les diverses valeurs possibles de α :

$$- 0,2 \leqslant r_o \leqslant + 0,4$$

En fait, les valeurs expérimentales de l'anisotropie d'émission n'atteignent jamais la valeur théorique calculée à partir de la relation précédente en raison de l'existence d'autres phénomènes modifiant la direction du moment de transition d'émission : rotation brownienne, vibrations de torsion, choc initial photon-molécule, transferts d'énergie et fluorescence secondaire.

Bien que seule l'étude de la rotation brownienne nous importe dans ce travail, il faut néanmoins examiner les autres phénomènes susceptibles d'intervenir.

Les transferts d'énergie et la fluorescence secondaire peuvent être éliminés en opérant à faible concentration. Quant à l'effet du choc initial photon-molécule, il est faible et peut être négligé dans la plupart des cas.

Par contre, les vibrations de torsion du fluorophore existent toujours, même à basse température. Elles provoquent des vibrations des oscillateurs d'absorption et d'émission autour de leur position d'équilibre. Dans le cas où ces oscillateurs sont linéaires et ont la même direction (excitation du premier état singulet), JABLONSKI [30] a obtenu la relation suivante :

$$r_o = 0,4 - 1,2\ u + 0,9\ u^2$$

où $u = \overline{\sin^2 \varepsilon}$ représente la valeur quadratique moyenne du sinus de l'angle entre la direction instantanée et la direction d'équilibre.

Si les amplitudes des vibrations de torsion sont faibles, il est possible de les décomposer suivant trois axes et d'écrire $\sin^2 \varepsilon \simeq \varepsilon^2 = 2\ \delta$, δ étant la dispersion d'angle autour d'un des deux axes de la molécule (les vibrations autour du troisième axe, qui est parallèle au moment de transition, ne provoquent pas de dépolarisation de la fluorescence).

Il est important de remarquer que r_o, valeur de l'anisotropie en l'absence de mouvement brownien de rotation, dépend donc de la température, de la nature du milieu (cage de solvatation, viscosité) et de la longueur d'onde. Il ne s'agit donc pas d'une constante moléculaire.

Enfin, la rotation brownienne provoque une dépolarisation de la fluorescence : entre l'instant initial où s'effectue l'absorption et l'instant t correspondant à l'émission, le moment de transition d'émission a tourné d'un certain angle $\theta(t)$. L'expression de l'anisotropie est la suivante :

$$r(t) = r_o \, M_2(t) = r_o < \frac{3 \cos^2 \theta(t) - 1}{2} >$$

La période des vibrations de torsion est irrégulière et toujours très courte (10^{-12} - 10^{-13} s) par rapport à la durée de vie de l'état excité. Par conséquent, la réduction de l'anisotropie due à ces vibrations, peut être considérée comme instantanée et abaisse seulement la valeur initiale de r(t) sans en altérer la forme.

L'enregistrement au cours du temps des composantes $I_{\parallel}(t)$ et $I_{\perp}(t)$ de la fluorescence excitée par un flash permet d'obtenir la fonction d'autocorrélation d'orientation $M_2(t)$.

Lorsque la lumière excitatrice est continue, la grandeur mesurée est l'anisotropie moyenne $\bar{r}$:

$$\bar{r} = \frac{\int_o^\infty r(t) \; I(t) dt}{\int_o^\infty I(t) dt}$$

I(t) étant l'intensité totale de la fluorescence pour laquelle on a la relation :

$$I(t) = I_{\parallel}(t) + 2 \, I_{\perp}(t)$$

Dans la plupart des cas, I(t) décroît selon une loi exponentielle du type :

$$I(t) = I_o \; e^{-t/\tau}$$

où τ désigne la durée de vie moyenne de l'état excité. Dans ces conditions, l'expression de $\bar{r}$ s'écrit :

$$\bar{r} = \int_o^\infty r(t) \; e^{-t/\tau} \; \frac{dt}{\tau}$$

II-1. MESURE DE L'ANISOTROPIE MOYENNE.

L'appareil construit par MONNERIE [31] et commercialisé par la Société DOIGNON-MAGOT (★) repose sur le principe suivant. L'échantillon est éclairé par une lampe à vapeur de mercure SP 500. Les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse sont sélectionnées à l'aide de filtres complémentaires afin d'éliminer la lumière diffusée. L'intensité de la fluorescence, analysée par un prisme de Glazebrook est mesurée par un photomultiplicateur 1 P 28. Une partie du faisceau incident est prélevée à l'aide d'une lame semi-réfléchissante et envoyée sur un photomultiplicateur de référence. Afin de compenser les fluctuations de la lampe, celui-ci est asservi par sa haute tension à débiter un courant constant, et cette même haute tension alimente le photomultiplicateur de mesure.

Un certain nombre de modifications ont été apportées (figure II-2). La source est remplacée par une lampe au xénon (OSRAM, XBO 250 W) et un polariseur est introduit sur le faisceau d'excitation. Le nouveau système électronique, mis au point par la Société 3 EP (★★), effectue le rapport entre le signal de mesure et le signal de référence, rapport qui est indépendant des fluctuations de la lampe. Le principe est le suivant : les courants débités par les photomultiplicateurs sont transformés en tension puis convertis en fréquence grâce à des convertisseurs tension-fréquence; ceux-ci sont couplés à des compteurs qui, lors d'une mesure, sont déclenchés simultanément. Lorsque le compteur aveugle de la voie référence a atteint 10^4, 10^5 ou 10^6 au choix, (ce qui correspond à des temps de comptage d'environ 1, 10 ou 100 sec respectivement) le compteur de la voie mesure est bloqué et affiche donc le rapport cherché.

(★) *44 avenue de la Gare - 94110 Arcueil*

(★★) *88 bis avenue Parmentier - 75011 Paris.*

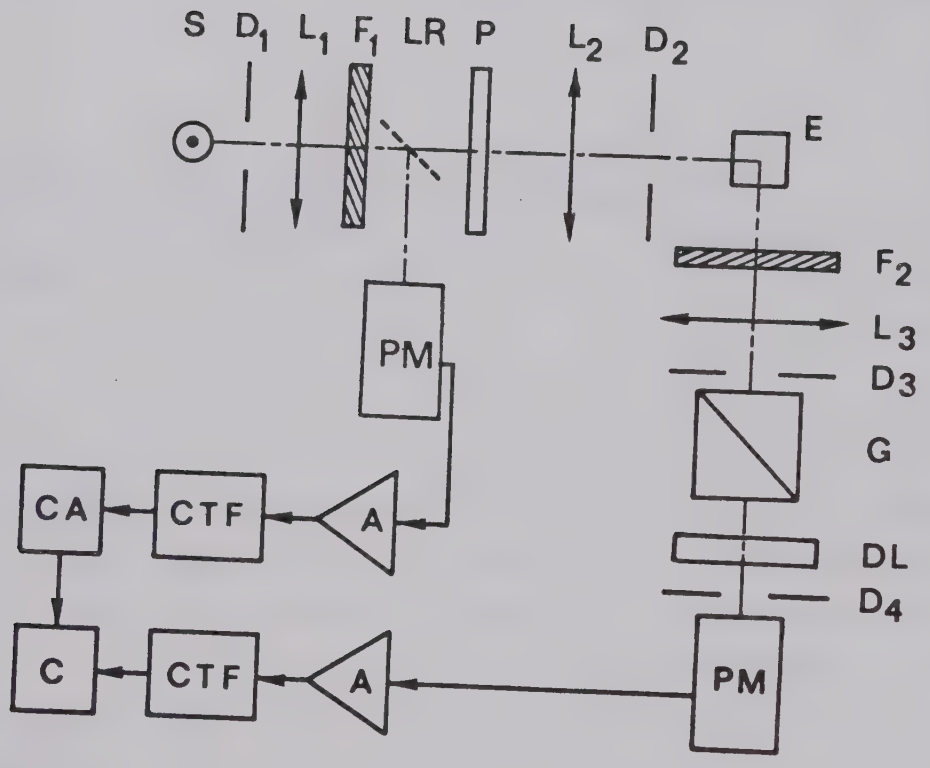


Fig. II-2 : Dispositif de mesure de l'anisotropie moyenne

S : source XBO 250 W

D_1 à D_4 : diaphragmes

L_1 à L_3 : lentilles

LR : lame semi-réfléchissante

F_1 ,F_2 : filtres optiques

G : glazebrook

P : polariseur

E : échantillon

DL : dépolariseur de Lyot

PM : photomultiplicateurs

A : amplificateurs

CTF : convertisseur tension-fréquence

CA : compteur aveugle

C : compteur de mesure

La précision sur la mesure de $I_{\parallel}$ ou $I_{\perp}$ est comparable à celle obtenue avec l'ancien dispositif, mais le nouveau système est plus adapté à certaines applications notamment pour les mesures simultanées d'inhibition et de polarisation de fluorescence.

II-2. MESURE DU DECLIN DE L'ANISOTROPIE.

II-2-1 . Appareillage

Pour déterminer les caractéristiques du déclin de la fluorescence, il existe deux types de méthodes: la fluorométrie de phase et la mesure directe du déclin de la fluorescence excitée par un flash. Bien que du point de vue formel, ces deux approches soient équivalentes, elles diffèrent totalement sur le plan expérimental.

En fluorométrie de phase [32, 33], l'échantillon est éclairé par une lumière modulée en intensité et la mesure porte sur le déphasage entre celle-ci et la fluorescence émise. Cette méthode est très précise lorsque le déclin est une exponentielle simple mais s'avère d'utilisation délicate lorsque le déclin n'est plus purement exponentiel (somme d'exponentielles ou fonction quelconque).

Dans la seconde technique, l'enregistrement direct du déclin peut se faire soit à l'aide d'un oscilloscope à échantillonnage couplé à un accumulateur de spectres [34 - 36], soit par la méthode du photoélectron unique mise au point par KOECHLIN [37] puis perfectionnée par de nombreux auteurs [38 - 44]

Cette méthode fournit des courbes d'une excellente précision sur plusieurs décades. Il est donc préférable de l'utiliser pour une analyse fine de la décroissance de la fluorescence et en particulier pour les mesures du déclin de l'anisotropie. C'est pourquoi nous avons construit un appareil fondé sur un principe équivalent à celui décrit par MIEHE [44].

Cet appareil est schématisé sur la figure II-3. L'échantillon est excité par une lampe ORTEC n°9352 délivrant des impulsions lumineuses répétitives produites par des décharges dans l'air entre deux électrodes

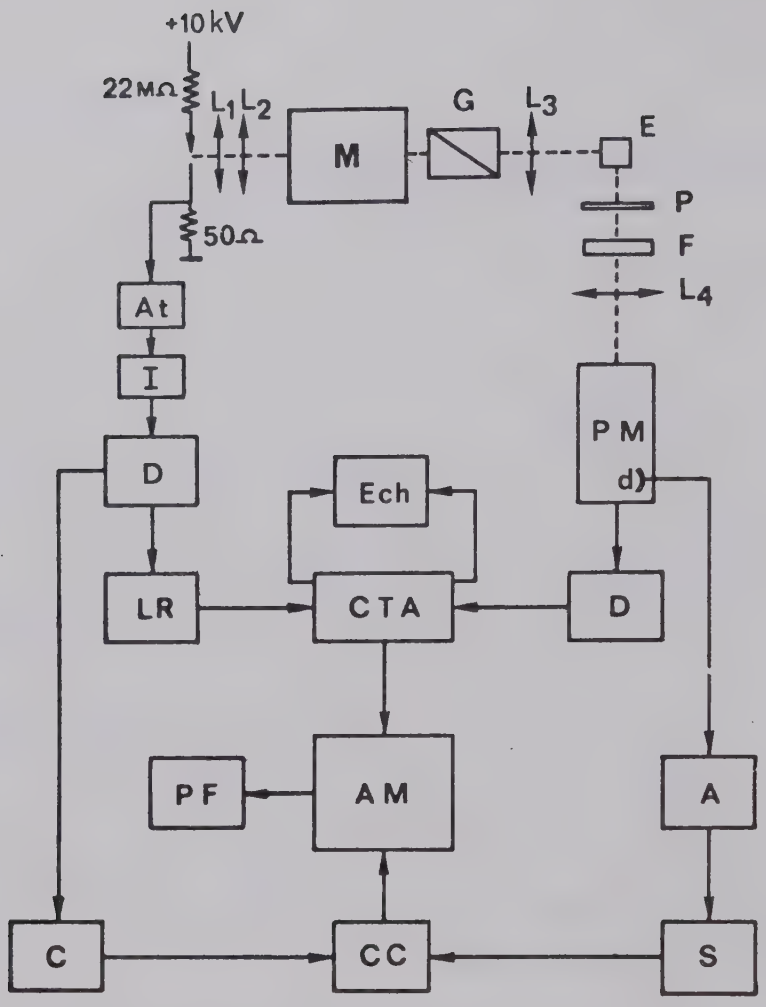


Fig. II-3 : Schéma de l'appareil de mesure du déclin de la fluorescence polarisée.

M : monochromateur

G : glazebrook

E : échantillon

P : polaroïd

F : filtre optique

L_1 à L_4 : lentilles

PM : photomultiplicateur RCA 8850

d : dernière dynode du photomultiplicateur

LR : ligne à retard

D : discriminateur SAIP 7018

CTA : convertisseur temps-amplitude ELRON TA 22

Ech : échelle de comptage-ratiomètre FERISOLL HB 220

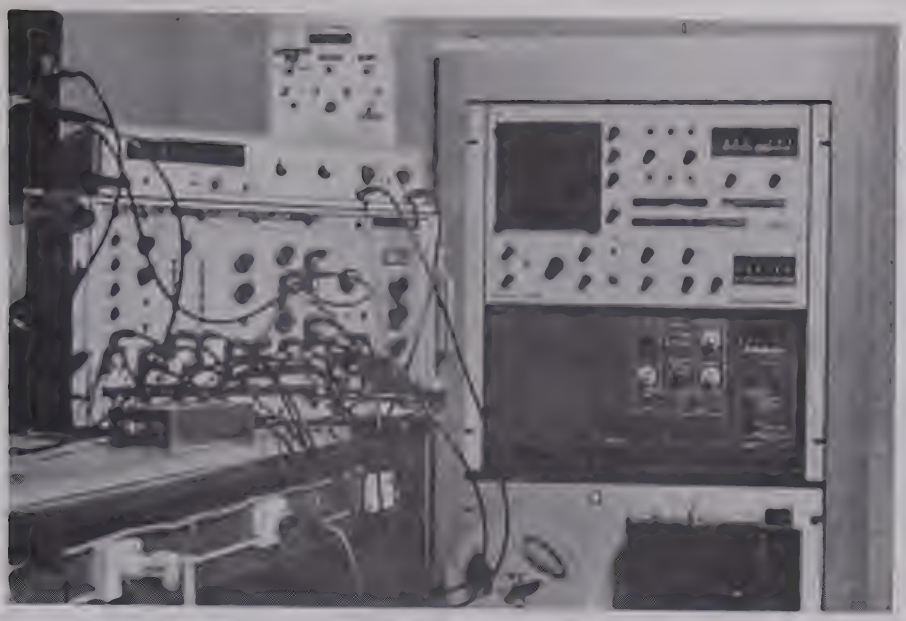
CC : circuit de coïncidence CRC 7052

C : circuit de mise en forme SAIP 7007

S : sélecteur de bande CRC 7060

AM : analyseur multicanaux INTERTECHNIQUE-DIDAC 800

PF : perforatrice de bande THALLY



Appareil de mesure du déclin de la fluorescence polarisée

de tungstène. La largeur à mi-hauteur des flashes produits est de l'ordre de 2 nsec et la fréquence de répétition est comprise entre 20 et 40 KHz. La lumière excitatrice dont la longueur d'onde est sélectionnée à l'aide d'un monochromateur BAUSCH & LOMB 33 - 86 - 45 , est polarisée verticalement par un prisme de Glazebrook et focalisée sur un porte-cellule thermostaté. La fluorescence émise est détectée à travers un filtre optique dans une direction faisant un angle de 90° avec le faisceau incident. Les composantes $I_{\parallel}$ et $I_{\perp}$ sont sélectionnées grâce à un polariseur POLAROID HNPB . Le détecteur est un photomultiplicateur RCA 8850 alimenté à 2500 V. Le bruit de fond à cette tension est d'une vingtaine de coups par seconde grâce à un anneau magnétique EMI C 122 disposé devant la photocathode: dans ces conditions un refroidissement s'est avéré inutile.

Le principe de l'électronique repose sur le fait que la probabilité de détecter un photon, émis par l'échantillon, à un instant donné après le flash est proportionnelle à l'intensité de fluorescence à cet instant. Pour obtenir la courbe de décroissance de l'intensité, il suffit donc d'effectuer la statistique des intervalles de temps séparant l'émission d'un flash et la détection d'un photon de fluorescence. Dans ce but, l'impulsion électrique associée au flash et l'impulsion issue du photomultiplicateur, mises en forme à l'aide de discriminateurs, sont envoyées sur un convertisseur temps-amplitude qui délivre une impulsion dont l'amplitude est proportionnelle à l'intervalle de temps séparant ces deux évènements. L'analyse statistique de ces impulsions est effectuée par un analyseur multicanaux. Lorsqu'un nombre suffisant d'évènements est mis en mémoire, la courbe de décroissance est reconstruite avec une excellente précision.

Cependant, la proportionnalité entre la probabilité de détection d'un photon à un instant donné et l'intensité de fluorescence à cet instant n'est vraie que si le photomultiplicateur ne détecte pas plus d'un photon par flash. Pour cette raison, le faisceau de la lampe est habituellement diaphragmé de telle façon que le pourcentage de flashes donnant naissance à un photon détecté soit inférieur à 5%. Le nombre d'évènements à plusieurs photons est alors négligeable.

Pour éviter cette réduction du flux de photons, qui accroît les durées d'expérience, la sélection des évènements à un photon peut être réalisée à l'aide du photomultiplicateur RCA 8850 dont la première dynode à grand gain(en phosphure de gallium) permet de distinguer l'émission de un, deux,..... photoélectrons dans le spectre d'amplitude (figure II.4). La méthode consiste alors à prélever le signal de la dernière dynode et, après amplification, un sélecteur de bande sélectionne les impulsions dont l'amplitude correspond à l'énergie d'un photoélectron. Enfin, grâce à un circuit de coïncidence, seuls les évènements relatifs à la détection d'un seul photon à la suite d'un flash sont pris en compte par l'analyseur multicanaux [41, 44] (figure II-3).

L'intervalle de temps séparant deux canaux est évalué en introduisant des lignes à retard calibrées (SAIP 7021) entre les deux entrées du convertisseur temps-amplitude.

Pendant la durée de l'expérience (de 1 h à 10 h selon les cas), la lampe fluctue en intensité et en fréquence de répétition bien que la forme du flash soit peu altérée. Aussi est-il important dans le cas de la mesure de l'anisotropie de fluorescence, qui fait intervenir la différence $I_{\parallel} - I_{\perp}$, de réduire les erreurs de comptage résultant de ces fluctuations. A cette fin, nous avons réalisé un système automatique qui permet d'enregistrer à intervalles réguliers, les composantes $I_{\parallel}$ et $I_{\perp}$ alternativement dans deux sous-groupes différents de l'analyseur multicanaux.

La sélection des composantes $I_{\parallel}$ et $I_{\perp}$ est assurée par le déplacement latéral, commandé par un moteur, d'un porte-polariseur possédant deux feuilles de POLAROID contigües orientées convenablement.L'horloge de l'analyseur multicanaux est utilisée en mode "cycles répétitifs avec temps d'arrêt"; le temps de comptage par cycle (en général 2 minutes) et le temps d'arrêt sont ajustables.

Tests de l'appareil :

Pour tester le bon fonctionnement de l'appareil, la durée de vie de l'anthracène en solution dans le cyclohexane est mesurée après déga-

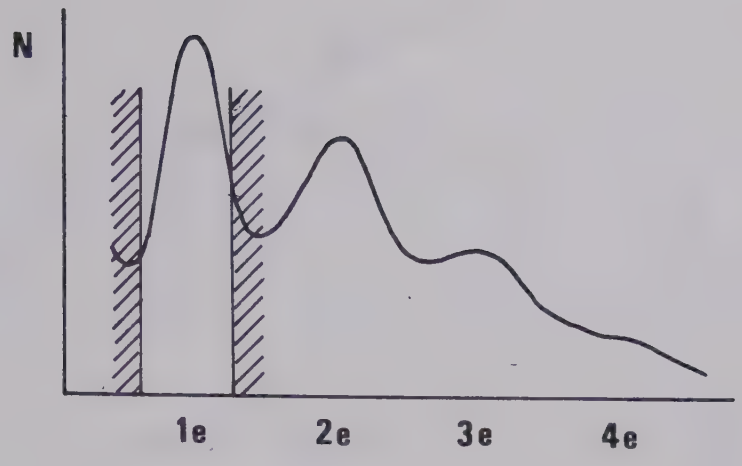


Fig. II-4- Spectre d'amplitude du photomultiplicateur RCA 8850 (Nombre relatif de coups en fonction du nombre de photoélectrons équivalents). Les zones hachurées délimitent la fenêtre d'amplitude utilisée.

-zage. La largeur du flash (★) n'étant pas négligeable la courbe enregistrée R(t) (figure II-5) est le produit de convolution du flash P(t) par la loi théorique de décroissance I(t) :

$$R(t) = P(t) \star I(t) = \int_0^t P(x)\, I(t-x)\,dx$$

avec $I(t) = I_o\, e^{-t/\tau}$ (τ : durée de vie)

La déconvolution et la détermination de τ a été effectuée à l'aide de la méthode des fonctions modulatrices (voir paragraphe suivant). La valeur de τ trouvée, soit 4,9 ns est précisément celle obtenue par BERLMAN [45]. La reconvolution par le flash donne un excellent accord avec la courbe expérimentale (figure II-5).

Il faut cependant noter que la fonction de transfert de l'appareil déforme les courbes aux temps très courts. Pour des constantes de temps inférieures à 2 ns, il existe plusieurs causes de déformation pro-

---

(★) Le rebond observé sur l'enregistrement du flash provient du photomultiplicateur. Son origine est mal connue. L'amplitude est d'environ 5% par rapport au maximum.

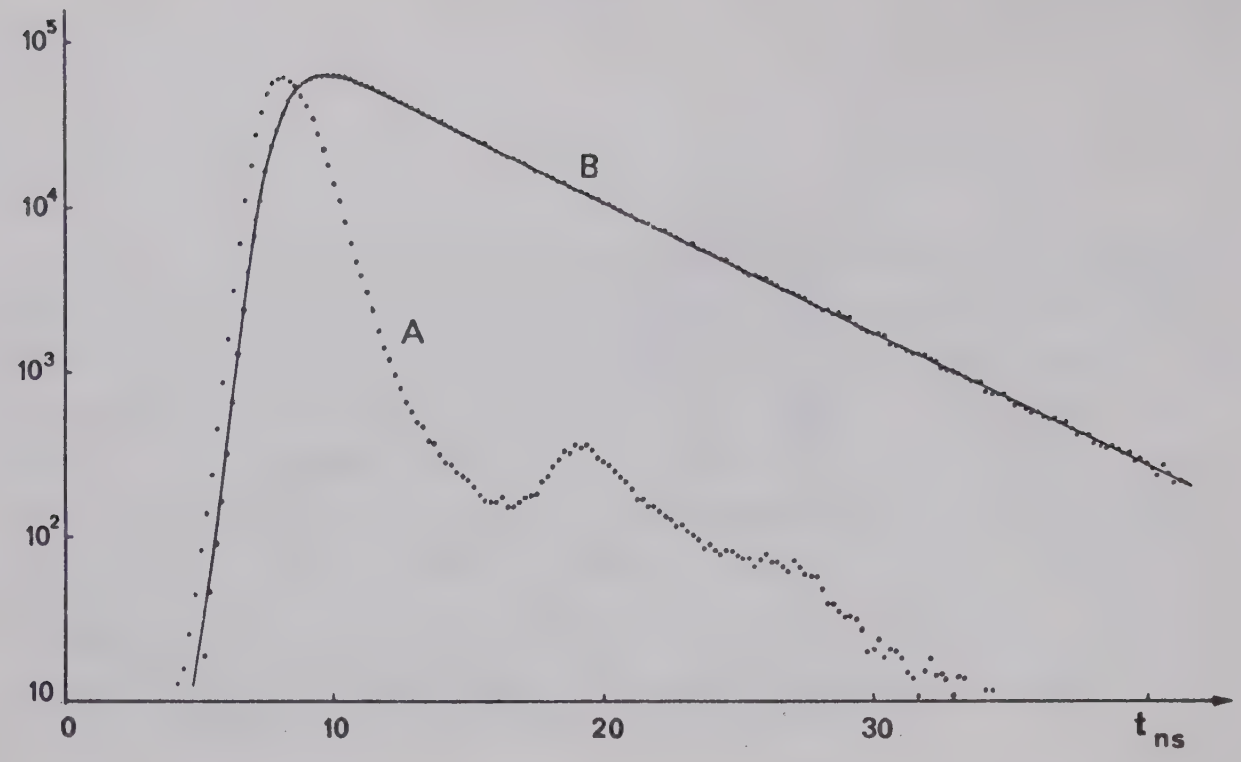


Fig. II-5 : Décroissance de l'intensité de fluorescence de l'anthracène en solution dans le cyclohexane [A : flash; B : courbe expérimentale (points) et reconvolution par le flash (courbe continue)].

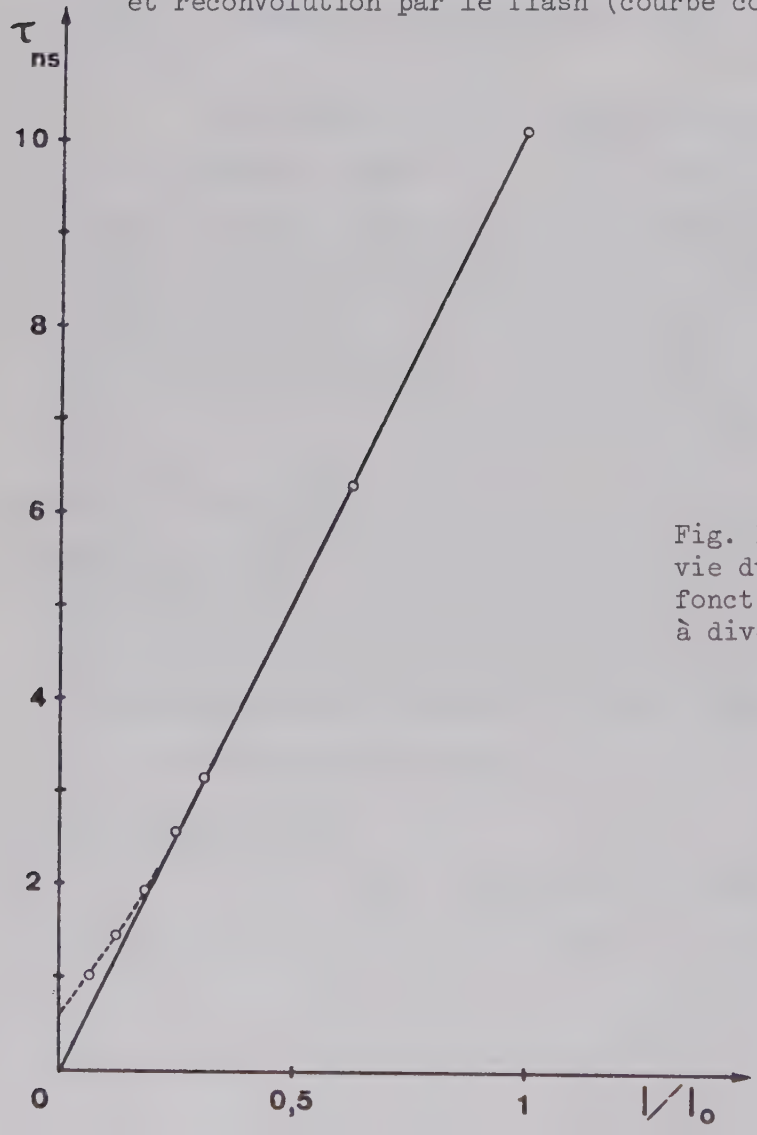


Fig. II-6 : Variations de la durée de vie du diméthyl-9,10 anthracène en fonction de l'intensité de fluorescence, à divers taux d'inhibition par CCl_4.

venant d'une part du photomultiplicateur [43] (fluctuations de l'amplitude des impulsions délivrées, fluctuations du temps de transit des photoélectrons, variations du temps de transit avec la longueur d'onde,....), d'autre part du flash (déplacement dans le temps et variations de forme (★)). Tous ces phénomènes ainsi que la largeur du flash limitent la bande passante de l'appareil.

Pour avoir une idée plus précise sur les déformations aux temps courts, la durée de vie du diméthylanthracène en solution dans le dichloro-1-2 éthane a été mesurée à divers taux d'inhibition par le tétrachlorure de carbone. Les valeurs des durées de vie ont été portées en fonction de l'intensité de la fluorescence (figure II-6). Des écarts par rapport à la linéarité sont observés à partir de 2 ns, alors que la loi de STERN-VOLMER (relation linéaire entre l'intensité et la concentration en inhibiteur) est parfaitement vérifiée dans tout le domaine exploré. En dessous de 2 ns, les valeurs expérimentales de τ sont supérieures aux valeurs théoriques en raison de la bande passante de l'appareil. La courbe $\tau = f(I)$ donne indirectement la fonction de transfert de l'appareil.

II-2-2 . Analyse des courbes de déclin par la méthode des fonctions modulatrices.

L'analyse des courbes expérimentales obtenues pose deux problèmes. D'une part l'excitation n'étant pas infiniment courte une déconvolution de la réponse expérimentale s'avère nécessaire dans la plupart des cas. D'autre part, le but est d'identifier les paramètres intervenant

---

(★) Le déplacement dans le temps est en général très faible <0,1 ns, mais l'effet d'élargissement au cours du temps est particulièrement sensible lorsque les temps d'expériences sont longs. Dans ce cas, le flash est enregistré toutes les deux ou trois heures; une moyenne peut être ainsi effectuée.

dans la loi théorique de décroissance.

De nombreuses méthodes ont été développées pour résoudre ces problèmes lorsque cette loi est une exponentielle simple ou une somme d'exponentielles ce qui est le cas le plus fréquent en fluorescence (évaluation de la durée de vie d'un fluorophore, détermination de plusieurs durées de vie intervenant simultanément dans des systèmes complexes : composés biologiques, excimères,...) ou en polarisation de fluorescence (anisotropie d'émission d'un fluorophore lié à un corps rigide asymétrique [39]).

Ces méthodes utilisent la transformation de Fourier [46] , les moments [47 , 48] , la transformation de Laplace [49, 50] , les modèles analogiques [51] , le plan de phase [52] , les moindres carrés [53 - 55]. La plupart d'entre elles se prêtent assez difficilement à l'établissement d'un programme de dépouillement automatique des données expérimentales. En effet les méthodes fondées sur les transformées de Fourier ou de Laplace, ou sur les moments prennent comme hypothèse de départ des durées d'expériences infinies, elles ne peuvent donc éliminer l'influence de la troncature qu'en ayant recours à des processus itératifs d'utilisation délicate, nécessitant parfois l'intervention de l'opérateur en cours de calcul.

La méthode des fonctions modulatrices que nous avons mise au point [59] ne présente pas ces inconvénients et permet d'analyser d'autres lois de décroissance qu'une somme d'exponentielles.

a/ Principe de la méthode

L'utilisation de fonctions modulatrices pour déterminer les coefficients d'une équation différentielle linéaire régissant un phénomène, a été mise au point par LOEB [56 - 58] . Le principe de cette méthode est le suivant :

Considérons par exemple l'équation différentielle

$$a_o y + a_1 \dot{y} + a_2 \ddot{y} = x \qquad \text{(II-1)}$$

dans laquelle x et y sont des grandeurs enregistrées au cours du temps.

Pour évaluer a_o, a_1 et a_2, on pourrait utiliser les valeurs de y, $\dot{y}$, $\ddot{y}$ et x en trois points pour résoudre le système linéaire d'équations dont a_o, a_1 et a_2 sont les solutions. Mais les enregistrements de x et y sont entachés d'erreurs sous forme de bruit et toute dérivation, renforçant les hautes fréquences du spectre, amplifie ce bruit.

L'emploi de fonctions modulatrices permet au contraire de se ramener à des calculs d'intégrales qui auront pour effet de lisser les courbes expérimentales.

Considérons un enregistrement de x et de y entre l'instant 0 et l'instant T. Soit $\phi(t)$ une fonction modulatrice, c'est-à-dire une fonction quelconque mais s'annulant, ainsi que sa dérivée première, pour t = 0 et t = T. Multiplions les deux membres de l'équation (II-1) par ϕ et prenons leurs intégrales de 0 à T :

$$\int_o^T (a_o \phi y + a_1 \phi \dot{y} + a_2 \phi \ddot{y}) dt = \int_o^T \phi x dt \qquad \text{(II-2)}$$

L'intégration par parties appliquée une fois sur le terme $a_1 \phi y$ et deux fois sur le terme $a_2 \phi y$ donne :

$$a_o \int_o^T \phi \, y dt + a_1 \left[\phi y\right]_o^T - a_1 \int_o^T \dot{\phi} \, y dt + a_2 \left[\phi \dot{y}\right]_o^T$$

$$- a_2 \left[\dot{\phi} y\right]_o^T + a_2 \int_o^T \ddot{\phi} y \, dt = \int_o^T \phi x \, dt$$

Les termes entre crochets étant nuls, il reste :

$$a_o \int_o^T \phi y \, dt - a_1 \int_o^T \dot{\phi} y \, dt + a_2 \int_o^T \ddot{\phi} y \, dt = \int_o^T \phi x \, dt \qquad \text{(II-3)}$$

Il suffit de choisir deux autres fonctions modulatrices η et ψ pour obtenir un système linéaire de trois équations dont a_o, a_1 et a_2 sont les solutions.

L'extension de la méthode à une équation d'ordre n est possible à condition que les fonctions modulatrices et leurs dérivées jusqu'à l'ordre n - 1 compris, s'annulent aux bornes de l'intervalle (0, T). Cette

généralisation conduit à l'équation :

$$a_o\int_o^T \phi y dt - a_1\int_o^T \dot{\phi} y\, dt + a_2\int_o^T \ddot{\phi} y\, dt + \ldots (-1)^n a_n \int_o^T \phi^{(n)} y dt = \int_o^T \phi x dt \quad \text{(II-4)}$$

b/ Cas d'une loi de décroissance multiexponentielle

La réponse impulsionnelle (excitation par un flash infiniment bref) peut, dans ce cas, s'écrire sous la forme :

$$S(t) = \sum_{i=1}^{N} A_i \exp\left(-\frac{t}{T_i}\right) \quad \text{(II-5)}$$

Le problème consiste à déterminer les amplitudes A_i et les constantes de temps T_i . S(t) satisfait à l'équation différentielle linéaire :

$$S + a_1\dot{S} + a_2\ddot{S} + \ldots\ldots + a_N S^{(N)} = 0 \quad \text{(II-6)}$$

dans laquelle

$$\begin{aligned} a_1 &= \sum_i T_i \\ a_2 &= \sum_{i<j} T_i T_j \\ a_3 &= \sum_{i<j<k} T_i T_j T_k \\ &\ldots\ldots\ldots\ldots \\ a_N &= T_1 T_2 T_3 \ldots\ldots T_N \end{aligned} \quad \text{(II-7)}$$

Remarquons que les constantes de temps $T_1, T_2, \ldots, T_N$ sont solutions de l'équation

$$T^N - a_1 T^{N-1} + a_2 T^{N-2} \ldots + (-1)^N a_N = 0 \quad \text{(II-8)}$$

Lorsque la largeur du flash n'est pas courte devant les constantes de temps des exponentielles, la courbe expérimentale obtenue R(t) est le produit de convolution de la fonction S(t) par la fonction P(t) représentative du flash .

$$R(t) = P(t) \star S(t) = \int_o^t P(\tau)\, S(t-\tau)\, d\tau \quad \text{(II-9)}$$

L'équation différentielle à laquelle satisfait R(t) peut se mettre sous la forme [59] :

$$R + a_1\dot{R} + a_2\ddot{R} + \ldots + a_N R^{(N)} = \alpha_1 P + \alpha_2 \dot{P} + \ldots + \alpha_N P^{(N-1)} \qquad \text{(II-10)}$$

Les coefficients a_i sont définis par les relations (II-7)

De plus
$$\alpha_1 = a_1 S(0) + a_2 \dot{S}(0) + \ldots + a_N S^{(N-1)}(0)$$
$$\alpha_2 = a_2 S(0) + a_3 \dot{S}(0) + \ldots + a_N S^{(N-2)}(0)$$
$$\ldots\ldots\ldots$$
$$\alpha_N = a_N S(0)$$

et

$$S(0) = \sum_i A_i$$
$$\dot{S}(0) = -\sum_i \frac{A_i}{T_i}$$
$$\ddot{S}(0) = \sum_i \frac{A_i}{T_i^2}$$
$$\ldots\ldots\ldots$$
$$S^{(k)}(0) = (-1)^k \sum_i \frac{A_i}{T_i^k}$$

Il faut remarquer que les coefficients a_i ne dépendent que des constantes de temps; par contre les coefficients α_i dépendent à la fois des constantes de temps et des amplitudes.

D'une façon générale,le nombre de fonctions modulatrices à utiliser est égal au nombre de coefficients inconnus dans l'équation différentielle (II-10), soit 2 N.

Pour une fonction ϕ, l'une des équations du système linéaire peut s'écrire sous la forme :

$$a_1 \int_o^T \dot{\phi}\, R\, dt - a_2 \int_o^T \ddot{\phi}\, R\, dt + \ldots + (-1)^{N-1} a_N \int_o^T \phi^{(N)}\, R\, dt +$$
$$\alpha_1 \int_o^T \phi\, P\, dt - \alpha_2 \int_o^T \dot{\phi}\, P\, dt + \ldots + (-1)^{N-1} \alpha_N \int_o^T \phi^{(N-1)}\, P\, dt = \int_o^T \phi\, R\, dt$$

(II-11)

Les coefficients a_1, a_2,.... a_N permettent de calculer les constantes de temps T_1, T_2,....T_N en résolvant l'équation (II-8).

Dans une seconde étape, connaissant les constantes de temps, les amplitudes seront évaluées à l'aide des coefficients α_1,α_2,....., α_n.

Il faut cependant remarquer qu'une telle détermination des amplitudes n'est possible que par la présence du flash. En effet, si la durée de celui-ci devenait négligeable par rapport aux constantes de temps des exponentielles, l'équation(II-10),tendrait vers l'équation(II-6). Pour atteindre une précision suffisante dans le calcul des amplitudes, il est donc nécessaire que le flash soit "modulé" par les fonctions modulatrices, de façon efficace. Cela n'est pas toujours possible dans la recherche d'un grand nombre d'exponentielles qui nécessite de nombreuses fonctions modulatrices, lesquelles doivent être suffisamment différentes (voir annexe).

Cette difficulté peut être levée en utilisant une autre méthode pour évaluer les amplitudes, connaissant les constantes de temps. Le calcul des moments incomplets de R(t) et du flash permet une telle détermination.

En effet, soit m_k et p_k les moments incomplets de R(t) et P(t), respectivement définis par :

$$m_k = \int_o^T t^k \, R(t)dt$$

et

$$p_k = \int_o^T t^k \, P(t)dt$$

On peut montrer que :

$$m_k = k! \sum_{i=1}^{N} A_i \left\{ \sum_{j=0}^{k} \frac{T_i^{j+1}}{(k-j)!} \left[p_{k-j} - T^{k-j} u_i(T) \right] \right\} \qquad \text{(II-12)}$$

où

$$u_i(T) = \exp(-\frac{T}{T_i}) \int_o^T P(\tau) \exp(\frac{\tau}{T_i}) d\tau$$

Le calcul des N premiers moments fournira donc un système de N équations linéaires en A_1, A_2.....A_N.

Il est à noter que les intégrales étant calculées entre 0 et T, il n'en résulte aucune erreur due à la troncature des courbes expérimentales.

Remarque : Lorsque la largeur du flash est petite par rapport aux constantes de temps, la méthode des fonctions modulatrices doit être appliquée directement à l'équation différentielle (II-6). Les amplitudes n'intervenant pas dans cette équation, elles peuvent être déterminées par la méthode des moments incomplets.

c/ Tests de la méthode

Dans le cas considéré des courbes de déclin de la fluorescence, les fonctions modulatrices doivent être choisies de telle façon que la modulation ne soit pas importante aux temps longs pour lesquels le rapport signal/bruit est plus faible et la modulation du flash peu efficace. Nous avons donc choisi des fonctions du type :

$$\phi(t) = t^n (T - t)^p$$

où T est la durée de l'enregistrement (voir annexe).

Afin d'étudier les possibilités de la méthode, nous avons simulé des courbes en convoluant par un flash, des lois théoriques dont on connait a priori les paramètres. Les résultats relatifs au cas de 1, 2 et 3 exponentielles (voir annexe) révèlent une excellente efficacité de la méthode des fonctions modulatrices. L'absence d'effet notable de troncature est observée, comme prévu.

Cependant, il s'agit dans ce cas de courbes théoriques dépourvues de bruit. Aussi est-il intéressant de tester la méthode avec des courbes expérimentales dont les paramètres sont connus a priori. Dans ce but, il suffit d'enregistrer séparément la décroissance de la fluorescence de différents fluorophores (ou d'un même fluorophore à divers taux d'inhibition). Les durées de vie ayant été déterminées, les courbes de décroissance sont combinées puis analysées.

Ainsi, la décroissance de la fluorescence du sulfate de quinine en solution dans H_2SO_4 0,1 N et celle du diméthyl-9,10 anthracène, en solution

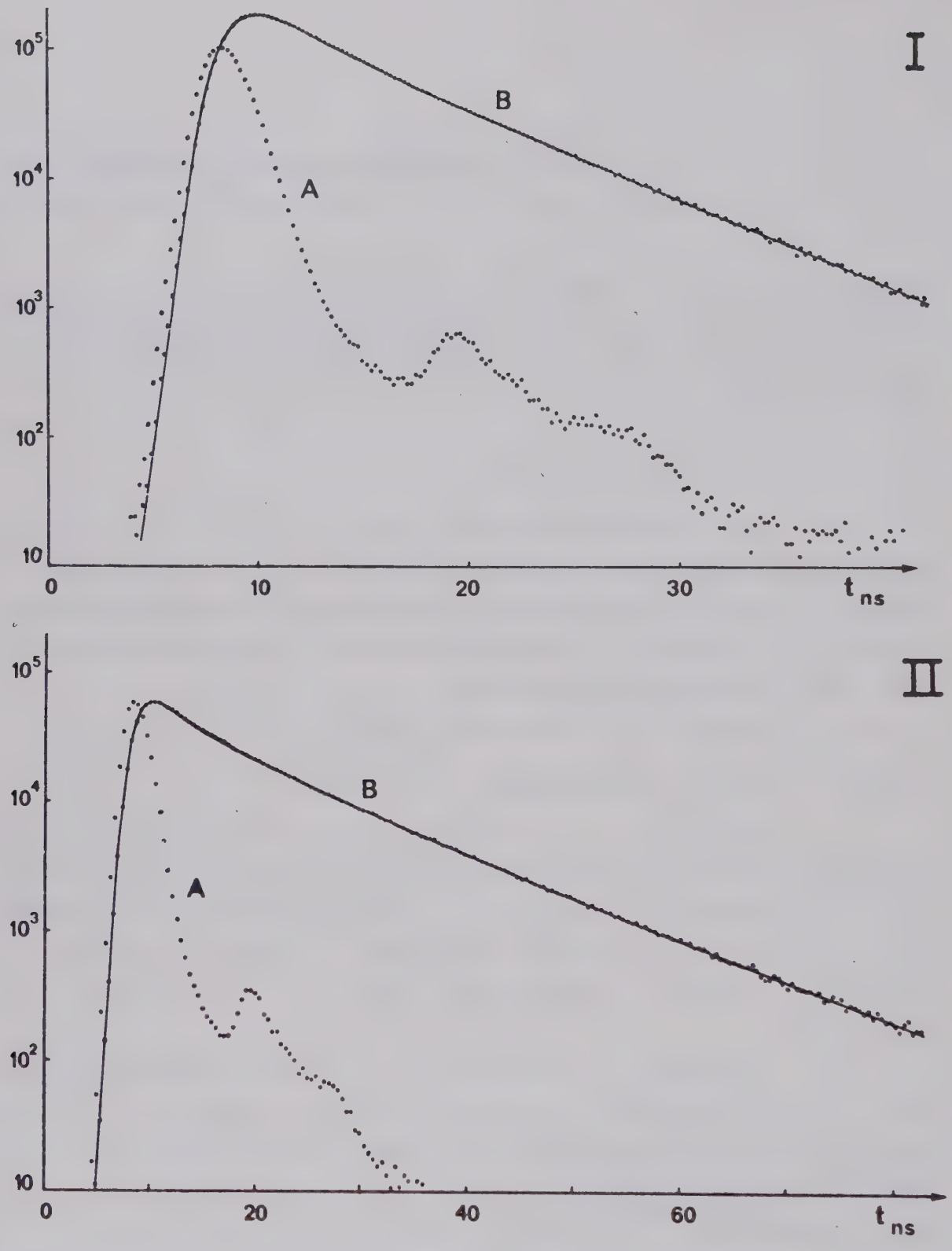


Fig. II-7 : Analyse d'une somme de 2 exponentielles (I) ou de 3 exponentielles (II) par la méthode des fonctions modulatrices.

A : flash

B : courbe expérimentale (points) et reconvolution par le flash (courbe continue).

dans le dichloro-1,2 éthane, ont été enregistrées, à divers taux d'inhibition, à l'aide de l'appareil décrit au paragraphe précédent.

Les résultats sont tout à fait satisfaisants avec une somme de deux exponentielles comme le montre le tableau II-1. La reconvolution avec le flash de la somme des exponentielles obtenues est en excellent accord avec la courbe expérimentale (Figure II-7 (I)).

Par contre dans le cas de trois exponentielles, les paramètres trouvés peuvent être notablement différents des valeurs réelles (Tableau II-1), bien que la reconvolution avec le flash conduise à une très bonne superposition avec la courbe expérimentale (Figure II-7 (II)). Ceci provient du fait que le nombre de paramètres cherchés est grand (3 amplitudes, 3 constantes de temps); par conséquent, même pour un niveau de bruit faible, il existe toute une famille de solutions qui donnent le même écart quadratique moyen par rapport à la courbe expérimentale.

	A_1	T_1 ns	A_2	T_2 ns	A_3	T_3 ns
Valeurs réelles	531	3,27	584	6,27	——	——
Valeurs trouvées	540	3,19	580	6,35	——	——
Valeurs réelles	333	3,45	413	6,28	746	13,1
Valeurs trouvées	569	3,34	553	8,65	467	14,6

Tableau II-1 - Recherche de deux ou trois exponentielles dans une courbe expérimentale (200 points).
(T_i : constantes de temps; A_i : amplitudes)

- largeurs de canal : 0,208 ns pour la courbe contenant 2 exponentielles
  0,416 ns pour la courbe contenant 3 exponentielles

- exposants des fonctions modulatrices :

  1 exponentielle : (4,14) (4,4)
  2 " : (4,32) (4,10) (4,5) (8,4)
  3 " : (4,32) (4,13) (4,7) (4,4) (7,4) (13,4).

En conclusion, la méthode des fonctions modulatrices présente les avantages suivants :

L'insensibilité au bruit est bonne, les données expérimentales étant filtrées par des intégrations. La précision des résultats est peu affectée par la limitation dans le temps des enregistrements. Cette absence d'effet de troncature constitue un avantage précieux sur la méthode des moments. En effet celle-ci utilise un processus itératif dont la convergence est mal définie et elle nécessite l'intervention de l'opérateur en cours de calcul. Au contraire, la méthode des fonctions modulatrices permet un dépouillement automatique des résultats.

En outre elle peut être employée comme méthode d'ajustement numérique à l'aide d'une somme d'exponentielles dont les paramètres n'ont plus de signification physique.

II-3. THEORIES DE LA POLARISATION DE LA FLUORESCENCE.

Les expressions de l'anisotropie instantanée d'émission $r(t)$ et de l'anisotropie moyenne $\bar{r}$, définies par les relations

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} = r_o M_2(t) = r_o \left\langle \frac{3\cos^2\theta(t) - 1}{2} \right\rangle$$

et $$\bar{r} = \int_o^\infty r(t)\, e^{-t/\tau} \frac{dt}{\tau} ,$$

vont être examinées dans divers cas lorsque seul le mouvement brownien est la cause extrinsèque de la dépolarisation de la fluorescence.

II-3-1. Molécules sphériques.

EINSTEIN a montré que la fonction d'autocorrélation était, dans ce cas, de la forme :

$$M_2(t) = e^{-6 D_r t}$$

où D_r est la constante de diffusion de rotation de la sphère, donnée par la relation :

$$D_r = \frac{k\,T}{6\eta V}$$

avec :
- k, constante de Boltzmann
- T, température absolue
- η, viscosité dynamique du solvant
- V, volume hydrodynamique de la sphère

Il en résulte l'expression :

$$R(t) = r_o\, e^{-6 D_r t} \qquad \text{(II-13)}$$

L'anisotropie moyenne est donnée par la relation de PERRIN [29]

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \frac{kT}{V\eta}\,\tau\right) \qquad \text{(II-14)}$$

Exprimée en fonction du temps de relaxation $\rho = 1/2D_r$, cette relation devient :

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \frac{3\tau}{\rho}\right) \qquad \text{(II-15)}$$

II-3-2.Molécules ellipsoïdales.

Le cas des molécules ellipsoïdales de révolution a été traité par PERRIN [60] puis par MEMMING [61]. A partir de ces résultats, WAHL [62] a obtenu l'expression :

$$r(t) = a_1 e^{-t/\theta_1} + a_2 e^{-t/\theta_2} + a_3 e^{-t/\theta_3} \qquad \text{(II-16)}$$

dans laquelle les temps de relaxation θ_1, θ_2, θ_3 sont fonctions du facteur d'allongement et du volume de l'ellipsoïde. Les coefficients a_1, a_2, a_3 dépendent de l'orientation des moments de transition par rapport aux axes de l'ellipsoïde.

Lorsqu'il s'agit de macromolécules de forme moyenne ellipsoïdale, possédant un fluorophore orienté au hasard par rapport à l'ellipsoïde, la relation obtenue par WEBER [63] est la suivante :

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \frac{3\tau}{\rho_h}\right) \qquad \text{(II-17)}$$

où ρ_h désigne la moyenne harmonique des temps de relaxation autour des axes.

II-3-3.Molécules asymétriques rigides.

L'extension au cas des molécules totalement asymétriques a été faite par divers auteurs [39, 64 - 66] est dans le cas le plus général, conduit pour r(t) à une somme de cinq exponentielles dont les constantes de temps font intervenir les coefficients de diffusion de rotation par rapport aux trois axes principaux de la molécule.

II-3-4. Macromolécules flexibles.

Pour un fluorophore inséré dans une chaîne macromoléculaire flexible, WAHL [67] a utilisé le modèle à sous-chaînes gaussiennes, puis plus récemment [62] a proposé un modèle constitué d'un enchaînement d'éllipsoïdes équivalents, chaque ellipsoïde représentant un segment de chaîne rigide. Dans ce dernier cas, r(t) est une somme de deux exponentielles.

La théorie de DUBOIS-VIOLETTE et coll. [15] dont il a déjà été question, conduit aux expressions suivantes valables aux temps longs.

$$r(t) = r_o \, K(Wt)^a$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_o} \, K' \, (W\tau)^b$$

avec : $a = -\frac{1}{2}$, $b = \frac{1}{2}$ pour un fluorophore solidaire de la chaîne principale

$a = -\frac{3}{2}$, $b = 1$ lorsqu'il est fixé à l'extrémité de la chaîne.

- Cas de la théorie proposée dans ce travail

Les expressions de la fonction d'autocorrélation établies dans la première partie peuvent être directement utilisées pour exprimer l'anisotropie d'émission.

Dans le cas où la chaîne est soumise à des mouvements entraînant une diffusion d'orientation des liaisons le long de la chaîne, la fonction d'autocorrélation est du type :

$$M_2(t) = e^{t/\rho} \, \mathrm{erfc} \sqrt{\frac{t}{\rho}}$$

Cette expression peut être utilisée si les écarts par rapport au réseau diamant ont un effet négligeable. Il en résulte les relations suivantes :

$$r(t) = r_o \, e^{t/\rho} \, \operatorname{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}} \qquad \text{(II-18)}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \sqrt{\frac{\tau}{\rho}}\right) \qquad \text{(II-19)}$$

Si ces écarts ne sont plus négligeables, la fonction d'autocorrélation peut se mettre sous la forme (§ I-5) :

$$M_2(t) = e^{-t/\theta} \, e^{t/\rho} \, \operatorname{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}}$$

d'où

$$r(t) = r_o \, e^{-t/\theta} \, e^{t/\rho} \, \operatorname{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}} \qquad \text{(II-20)}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_o}\left[1 + \frac{\tau}{\theta} + \sqrt{\frac{\tau}{\rho}\left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right)}\right] \qquad \text{(II-21)}$$

II-4. COMPARAISON DES METHODES DE DETERMINATION DES TEMPS DE RELAXATION.

Après avoir décrit les appareillages et exposé les théories, nous allons maintenant examiner les méthodes permettant de déterminer les temps de relaxation en insistant sur les avantages et les inconvénients de chacune d'elles.

II-4-1. Mesure de la polarisation en excitation continue.

Cette méthode, la plus utilisée, consiste à suivre l'évolution de l'anisotropie moyenne en fonction de la température ou de la viscosité du milieu. Les valeurs de $1/\overline{r}$ sont portées en fonction de T/η. Si la relation est linéaire, c'est-à-dire du type PERRIN (relation II-14), la pente permet de calculer le temps de relaxation à condition de connaître avec précision la durée de vie. Par contre, si les mouvements ne sont pas isotropes, $1/\overline{r}$ ne varie plus linéairement avec T/η, et le dépouillement des résultats est plus difficile.

Il est à noter que des précautions doivent être prises à propos de la durée de vie du fluorophore. Elle est en effet susceptible de varier avec la température et le milieu (viscosité, nature du solvant, pH,....). Une correction peut être facilement effectuée puisque la quantité $(I_{\parallel} + 2I_{\perp})$ est proportionnelle à la durée de vie.

L'avantage de cette méthode est sa facilité de mise en oeuvre et d'utilisation. Bien que l'analyse des résultats présente souvent des difficultés, la sensibilité des mesures permet une analyse qualitative précieuse.

II-4-2. Analyse du déclin de l'anisotropie.

Cette technique fournit directement la fonction d'autocorrélation d'orientation $M_2(t)$ et permet donc d'analyser les processus de relaxation sans qu'il soit nécessaire de faire varier la température et la viscosité. Il est ainsi possible de déterminer les temps de relaxation lorsque la forme de $M_2(t)$ est connue, ou bien de tester un modèle théorique proposé.

Dans le cas de macromolécules flexibles, des informations sur la distribution $G(\sigma)$ des temps de relaxation peuvent être obtenues sans postuler a priori la forme de $M_2(t)$ dont l'expression est (§ I-4-2) :

$$M_2(t) = \int_o^\infty G(\sigma)\ e^{-t/\sigma}\ d\sigma$$

$$\text{avec} \quad \int_o^\infty G(\sigma)d\sigma = 1$$

Le temps de relaxation moyen, c'est-à-dire le moment d'ordre 1 de la distribution, à savoir

$$< \sigma > = \int_o^\infty \sigma\ G(\sigma)\ d\sigma$$

n'est autre que :

$$< \sigma > = \frac{1}{r_o} \int_o^\infty r(t)dt = \frac{1}{r_o} \int_o^\infty \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}\ dt$$

De la même façon les moments m_2, m_3,..... (d'ordre 2, 3,....) de $G(\sigma)$ peuvent être déterminés, puisqu'ils sont liés aux moments de $r(t)$ par la relation :

$$m_{k+1} = \frac{1}{r_o}\ \frac{r_k}{k!}$$

$$\text{avec} \quad m_k = \int_o^\infty \sigma^k\ G(\sigma)\ d\sigma$$

$$r_k = \int_o^\infty t^k\ r(t)\ dt$$

Cette méthode est donc très puissante. Cependant l'appareillage est onéreux et de mise au point délicate. Actuellement la technique est limitée par la largeur des flashes disponibles ($\geqslant$ 2 ns), mais les progrès

réalisés dans la technologie des lasers et des photomultiplicateurs permettront très prochainement d'étudier des phénomènes dont les temps de relaxation sont inférieurs à la nanoseconde.

II-4-3. Mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence.

Cette méthode, décrite par HEINTZ [68] puis reproposée par WEILL [69], consiste à suivre les variations de l'anisotropie moyenne en fonction de la durée de vie τ, grâce à l'addition progressive d'un inhibiteur de fluorescence. Les temps de relaxation peuvent être ainsi déterminés comme le montrent par exemple les relations :

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \frac{3\tau}{\rho}\right)$$

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \sqrt{\frac{\tau}{\rho}}\right)$$

Lorsque aucune hypothèse n'est faite sur $M_2(t)$ cette technique permet d'explorer la transformée de la fonction d'autocorrélation selon la relation :

$$\bar{r} = r_o \int_o^\infty M_2(t)\, \frac{e^{-t/\tau}}{\tau}\, dt$$

Si l'on considère, en outre, une fonction de distribution de temps de relaxation, le temps de relaxation moyen peut être évalué de la façon suivante. En reprenant les notations du paragraphe précédent, l'anisotropie moyenne s'écrit :

$$\bar{r} = \frac{r_o}{\tau} \int_o^\infty \frac{1}{\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\sigma}}\, G(\sigma)\, d\sigma$$

$$= \frac{r_o}{\tau} \int_o^\infty \sigma\left(1 - \frac{\sigma}{\tau} + \frac{\sigma^2}{\tau^2} - \ldots\ldots\right) G(\sigma)\, d\sigma$$

$$= \frac{r_o}{\tau}\left(m_1 - \frac{m_2}{\tau} + \frac{m_3}{\tau^2} - \ldots\ldots\ldots\right)$$

où m_1, m_2, m_3,.... désigne les moments de la distribution $G(\sigma)$. Ainsi, le temps de relaxation moyen $m_1 = < \sigma >$ apparaît comme la limite de $\overline{r\tau}\ /r_o$ lorsque τ tend vers l'infini. Les valeurs de $1/\overline{r\tau}$ sont donc portées en fonction de $1/\tau$ et l'extrapolation à $1/\tau = 0$ donne $1/r_o < \sigma >$, d'où la valeur de $< \sigma >$ si l'on connaît r_o.

Bien que séduisante dans son principe, cette méthode présente certaines difficultés.

- la condition de proportionnalité entre l'intensité totale de la fluorescence que l'on mesure, et la durée de vie doit être respectée.

- la durée de vie en l'absence d'inhibiteur ainsi que l'anisotropie fondamentale doivent être mesurées par une autre technique.

- lorsque des quantités relativement importantes d'inhibiteur sont nécessaires, il peut en résulter des effets de solvatation préférentielle, des variations de la viscosité du milieu,.... etc.... Ces paramètres agissent en outre sur la valeur de r_o. L'utilisation de l'oxygène sous fortes pressions, comme inhibiteur [70], doit permettre d'éliminer ces inconvénients.

Troisième partie

ETUDE PAR POLARISATION DE FLUORESCENCE DU MOUVEMENT BROWNIEN DU POLYSTYRENE EN SOLUTION

Nous indiquerons tout d'abord succinctement les applications de la polarisation de fluorescence à l'étude des polymères en solution en soulignant les problèmes rencontrés. Puis, après avoir décrit la synthèse d'un polystyrène contenant un noyau anthracène inséré dans la chaîne, nous entreprendrons de contrôler la validité des théories proposées dans ce travail. A cette fin la technique du déclin de l'anisotropie [22] et la méthode d'inhibition et de polarisation de fluorescence [110] seront mises à profit. Enfin, l'influence de la direction du moment de transition (dans l'axe de la chaîne ou perpendiculaire à celle-ci) sera examinée.

III-1. APPLICATIONS DE LA POLARISATION DE FLUORESCENCE A L'ETUDE DES POLYMERES EN SOLUTION.

Les applications des diverses techniques de polarisation de fluorescence à l'étude du mouvement brownien des polymères en solution diluée sont les suivantes (*) :

- mesure de l'anisotropie moyenne :

Les polymères suivants ont été étudiés par cette méthode : polystyrène [71 - 73] , polyéthylènimine [74, 75] , polyacrylamide [76] , acides polyacrylique et polyméthacrylique [77 - 80] , polyméthacrylate de méthyle [80, 81] , poly p-aminostyrène [67] , polyvinylamine [67] , polyoxyéthylène [78, 82, 83] , polytétrahydrofuranne [78, 83] , polydioxolanne-1,3 [83] , hydroxyéthylcellulose [84] .

Dans la plupart de ces études, les variations de $1/\overline{r}$ sont représentées en fonction de T/η . Un comportement linéaire est souvent observé lorsque les mesures sont effectuées en faisant varier soit la température, soit la viscosité à température constante en changeant le solvant. Cependant, lorsque ces deux types de variations sont étudiées conjointement, les courbes $1/\overline{r} = f(T/\eta)$ ne se superposent pas.

Ce comportement est attribué d'une part au fait que la qualité du solvant au sens thermodynamique peut modifier la relaxation de la chaîne [78, 81, 83] , d'autre part à la présence d'une énergie d'activation pour les mouvements.

(*) *Le cas des macromolécules biologiques et celui des solutions concentrées de polymère ne seront pas considérés.*

Néanmoins, dans un certain nombre de cas, une courbure vers l'axe T/η est observée aux faibles valeurs de T/η, en raison de l'existence d'une distribution de temps de relaxation et des variations éventuelles de l'anisotropie fondamentale avec la température et la viscosité. D'autre part les transitions conformationnelles peuvent se refléter sur ces courbes [79, 83]. Ces phénomènes rendent délicats la détermination de l'anisotropie fondamentale. Il est donc souvent difficile d'évaluer le temps de relaxation moyen par cette technique.

L'influence de la viscosité a été étudiée par ANUFRIEVA et coll. [81] dans le cas du polyméthacrylate de méthyle dans des mélanges acétate de méthyle-triacétine; le temps de relaxation ρ, déterminé à partir de la relation de PERRIN (II-15), variait linéairement en fonction de la viscosité dans le domaine 0,4 à 1 cp. Dans un domaine plus large de viscosité (0,5 à 12 cp), BIDDLE et NORDSTROM [73] ont observé une courbure de $\rho = f(\eta)$ pour le polystyrène dans divers solvants.

En ce qui concerne l'influence de la masse moléculaire, l'ensemble des travaux confirme le fait que le temps de relaxation atteint rapidement un palier lorsque la masse moléculaire augmente.

- Analyse du déclin de l'anisotropie :

WAHL [85] a proposé le premier l'application de cette technique à l'analyse du mouvement des chaînes macromoléculaires. Dans le cas du polystyrène [62] , il a montré que le déclin de l'anisotropie pouvait s'interprêter à l'aide d'une somme de deux exponentielles compatible avec un modèle d'ellipsoïdes équivalents :

$$r(t) = r_o(0{,}75\ e^{-t/\theta_1} + 0{,}25\ e^{-t/\theta_3})$$

D'autre part, des mesures effectuées dans des mélanges chlorobenzène-pyralène ont révélé que le temps de relaxation θ_{-1} défini par :

$$\frac{1}{\theta_{-1}} = \frac{0{,}75}{\theta_1} + \frac{0{,}25}{\theta_3}$$

était une fonction linéaire de la viscosité dans le domaine 0,8 - 5 cp.

NORTH et SOUTAR [86] ont étudié toute une série de polymères vinyliques et acryliques, mais la précision de la technique expérimentale utilisée n'a permis à ces auteurs que de déterminer un temps de relaxation moyen.

- Mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence.

WEILL [69] a étudié par cette méthode des polystyrènes portant un groupement diphényl-9, 10 anthracène fixé en bout de chaîne ou en chaîne latérale. Dans les deux cas, cet auteur a obtenu une variation linéaire de $1/\overline{r}$ en fonction de l'intensité de fluorescence, c'est à dire en fonction de la durée de vie.

Récemment, BROWN et SOUTAR [87] ont observé un comportement analogue pour un copolymère styrène-vinyl-9 anthracène.

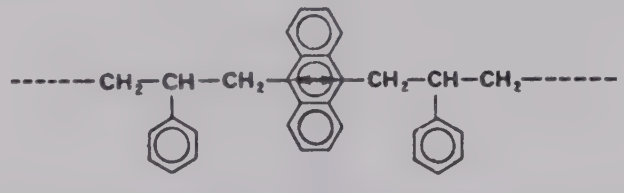
III-2. SYNTHESE D'UN POLYSTYRENE POSSEDANT UN FLUOROPHORE INSERE DANS LA CHAINE.

III-2-1. Choix du fluorophore.

Les critères du choix d'un fluorophore sont les suivants :

- son encombrement doit être le plus faible possible afin qu'il reflète au mieux les mouvements de la chaîne.
- ses moments de transition d'absorption et d'émission doivent être de préférence confondus et tels que leur direction commune corresponde à l'axe de la rotation propre du fluorophore une fois fixé. Ainsi cette rotation n'interviendra pas dans la mesure de l'anisotropie d'émission.
- en outre, pour appliquer de façon valable la théorie exposée dans ce travail, cette direction commune des moments de transition doit correspondre à une liaison de la chaîne.

Ces diverses raisons nous ont conduit à choisir l'anthracène fixé à la chaîne en position 9, 10 :



La double flèche indique la direction commune des moments de transition d'absorption et d'émission pour le premier état singulet.

L'anisotropie fondamentale r_o de l'anthracène est, d'après la plupart des auteurs, de l'ordre de 0,2 [29, 103, 104] , quelle que soit la méthode utilisée pour sa détermination (★). Cette valeur relativement

---

(★) *Une exception concerne la mesure dans le glycérol à - 80°C qui conduit à une valeur de r_o de l'ordre de 0,35 [105, 106].*

basse, puisque la valeur théorique est 0,4, révèle vraisemblablement l'existence de vibrations de torsion assez importantes. En appliquant la relation de JABLONSKI [30] .

$$r_o = 0,4 - 1,2\ u + 0,9\ u^2$$

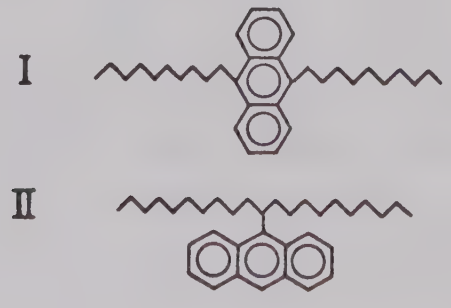
mentionnée précédemment (deuxième partie), la dispersion angulaire δ du moment de transition autour d'un des axes de la molécule est de l'ordre de 18°.

Ces vibrations de torsion dont la période est de l'ordre de 10^{-13} s [106], ont seulement pour effet de réduire la valeur initiale de r(t).

Par ailleurs, la valeur de r_o dépend très peu de la longueur d'onde de la lumière excitatrice dans la bande d'absorption correspondant au premier état singulet; il est toutefois nécessaire d'opérer à des concentrations faibles en anthracène (< 10^{-5} M) [103, 106].

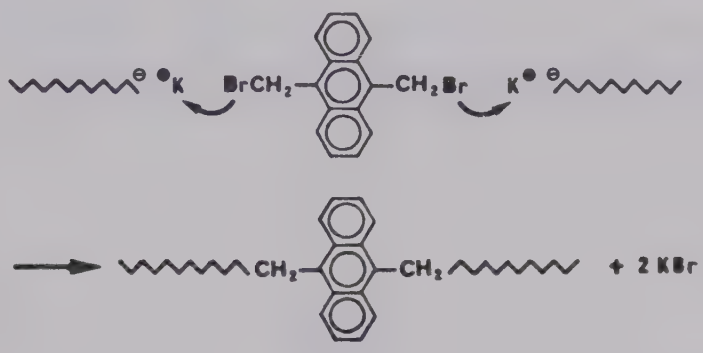
III-2-2. Principe de la méthode d'insertion.

Une telle insertion a déjà été réalisée par ANUFRIEVA et coll. [88] par copolymérisation radicalaire d'un monomère vinylique et du vinyl-9 anthracène. Cependant, le polymère obtenu contient des noyaux anthracène fixés de deux façons différentes :



La proportion de l'espèce II, bien que plus faible que celle de l'espèce I, n'est pas négligeable et perturberait les mesures de polarisation de fluorescence.

La méthode que nous avons utilisée est inspirée des travaux de FINAZ, GALLOT, PARROD et REMPP [89] et consiste à ajouter un agent de couplage bifonctionnel contenant un noyau anthracène, à un polystyrène "vivant" monofonctionnel. L'agent de couplage choisi est le bis(bromométhyl)-9,10 anthracène et la réaction s'écrit :



Le polymère vivant étant monofonctionnel, chaque macromolécule ne contient qu'un noyau anthracène en son milieu.

III-2-3. Polymérisation et couplage

Le bis(bromométhyl)-9,10 anthracène a été obtenu en deux étapes :

1/ préparation du bis(chlorométhyl)-9,10 anthracène par action de la paraformaldéhyde et de l'acide chlorhydrique sur l'anthracène selon la méthode décrite par MILLER [90].

2/ passage du bis(chlorométhyl)-9, 10 anthracène au bis(bromométhyl)-9,10 anthracène par échange à l'aide du bromure de sodium [91] .

	Prélèvement			Polymère couplé		
Essai N°	Position du maximum	$\overline{Mn}$	$\overline{Mp}$	Position du maximum	$\overline{Mn}$	$\overline{Mp}$
1	31.000	30.000	34.000	64.000	52.000	69.000
2	58.000	56.000	69.000	105.000	84.000	110.000
3	36.000	34.000	39.000	73.000	60.000	79.000

Tableau III-1 : Mesures de la masse moléculaire à partir des diagrammes de GPC avant et après couplage du polystyrène par le bis(bromométhyl)-9,10 anthracène.

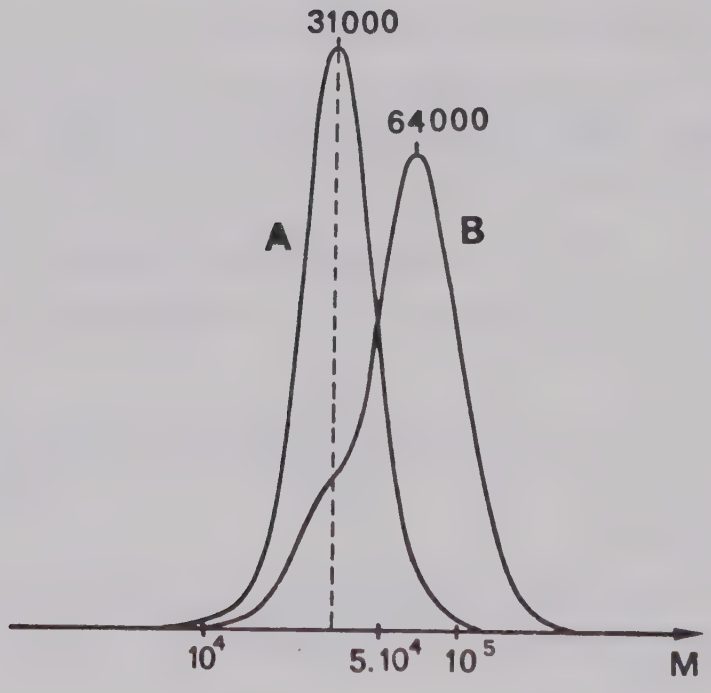


Fig. III-1 : Analyse par GPC de la distribution de masse moléculaire du polystyrène (essai n°1) avant (A) et après (B) couplage.

La polymérisation du styrène (★), amorcée par du cumyl-potassium (ORGMET) a été effectuée dans le tétrahydrofuranne à - 50°C sous argon. Après avoir prélevé une partie du polymère, le bis(bromométhyl)-9,10 anthracène est ajouté très progressivement en maintenant la température à - 50°C jusqu'à un léger excès par rapport à la quantité théorique nécessaire à un couplage total. La coloration rouge du milieu réactionnel devient alors brune. Puis, en laissant la température revenir lentement à l'ambiante, une décoloration progressive puis totale est observée. Le polymère obtenu est précipité dans le méthanol et séché sous vide à 40°C.

L'analyse par la technique de chromatographie par perméation de gel du polymère obtenu et du prélèvement montre bien que la masse a été sensiblement doublée grâce au couplage. Les résultats sont reportés dans le tableau III-1 et la figure III-1 donne un exemple des chromatogrammes qui ont été obtenus; l'épaulement observé sur la courbe B montre que certaines chaînes n'ont pas été couplées en raison des impuretés du milieu réactionnel qui ont détruit quelques centres actifs.

(★) Nous avons réalisé cette synthèse au Centre de Recherches sur les Macromolécules de Strasbourg sous la direction de M.P. REMPP.

III-3. CARACTERISTIQUES SPECTRALES DU POLYSTYRENE MARQUE.

Avant d'utiliser le polystyrène ainsi marqué, (désigné par par PS-A) , il est primordial d'éliminer toute trace de fluorophore libre. Dans ce but le polymère en solution dans le tétrahydrofuranne est reprécipité plusieurs fois dans le méthanol jusqu'à ce que les caractéristiques spectrales de l'échantillon (densité optique, intensité de fluorescence par unité de masse et taux de polarisation de fluorescence) restent constantes. Pour les premières reprécipitations, un contrôle simple et rapide consiste à faire une chromatographie sur gel de silice (MERCK Art. 5748; solvant : tétrahydrofuranne; éluant : méthanol).

Le nombre de reprécipitations à effectuer dépend évidemment de l'excès de fluorophore ajouté par rapport à la quantité qui a servi au couplage.

Toutes les expériences décrites dans la suite de ce travail ont été effectuées avec le polystyrène couplé lors du premier essai (voir tableau III-1). La masse moléculaire moyenne en nombre est de 52.000. Quatre reprécipitations ont été suffisantes pour éliminer tout le fluorophore libre.

III-3-1. Spectres, coefficient d'extinction.

Il est intéressant de comparer les propriétés spectrales du polymère PS-A et du diméthyl-9,10 anthracène (DMA) qui peut être considéré comme modèle du fluorophore inséré dans la chaîne. Les spectres de fluorescence et d'excitation de ces deux composés en solutions dans le dichloro-1,2 éthane (★) ont été tracés sur le spectrofluorimètre FICA 55 000 (Figure III-2 et III-3). Les spectres du polymère PS-A sont analogues à ceux du DMA bien que ceux-ci soient décalés de 5 nm vers les courtes longueurs d'onde.

(★) Diméthyl-9,10 anthracène réf. ALDRICH D14, 670-6

Dichloro-1,2 éthane pour spectrophotométrie réf. MERCK 953

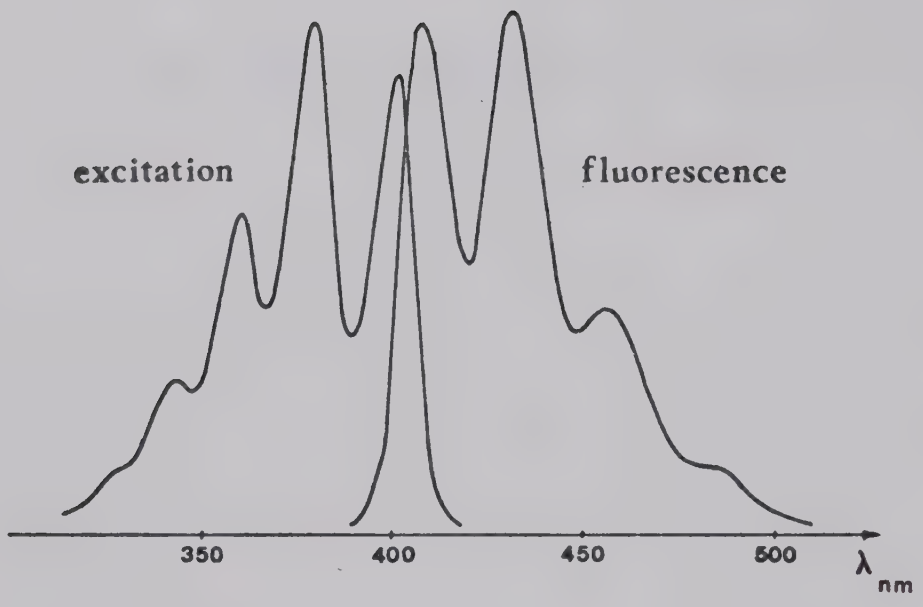


Fig. III-2 : Spectres d'excitation et de fluorescence du diméthyl-9,10 anthracène en solution dans le dichloro-1,2 éthane (concentration : 10^{-5} M).

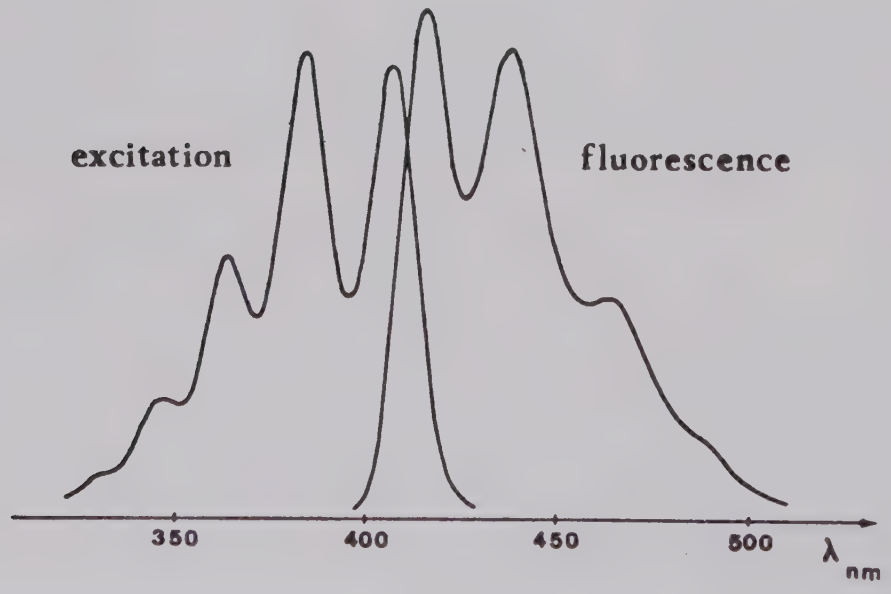


Fig. III-3 : Spectres d'excitation et de fluorescence du polystyrène PS-A en solution dans le dichloro-1,2 éthane (concentration : 0,3 g/ℓ)

D'autre part les spectres d'absorption, identiques aux spectres d'excitation, ont permis de mesurer les coefficients d'extinction molaire de ces composés dans le dichloro-1,2 éthane :

ε_{PS-A} = 7500 à 407 nm (avec $\overline{Mn}$ = 52.000)
ε_{DMA} = 8500 à 402 nm

Ces valeurs confirment le fait qu'il y a sensiblement un fluorophore par chaîne.

L'écart entre les coefficients d'extinction peut s'interpréter soit par la différence de chromicité entre le fluorophore inséré et le modèle, soit par le fait que les chaînes quin'ont pas été couplées, ne possèdent pas de fluorophore à leur extrémité.

III-3-2. Durée de vie.

La durée de vie du fluorophore inséré dans la chaîne a été déterminée à l'aide de l'appareil décrit dans la deuxième partie. Le filtre d'analyse utilisé a pour référence BALZERS K-2. La longueur d'onde d'excitation est de 380 nm. Il en sera de même pour toutes les expériences qui suivront.

La figure III-4 représente les variations de l'intensité totale ($I = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$) en fonction du temps pour le DMA et le polystyrène PS-A en solution dans le dichloro-1,2 éthane. Les solutions ont été soigneusement dégazées afin d'éliminer l'influence inhibitrice de l'oxygène. Les courbes ont été déconvoluées et analysées par la méthode des fonctions modulatrices. La durée de vie du DMA est de 13,9 ns. Par contre la décroissance de l'intensité du polystyrène PS-A n'est pas purement exponentielle.

Un tel phénomène pourrait provenir des chaînes qui n'ont pas été couplées lors de la synthèse, mais qui posséderaient néanmois à leur extrémité un noyau anthracène dont la durée de vie serait légèrement différente. Afin de contrôler cette hypothèse, une séparation quantitative de 50 mg de polymère a été réalisée par chromatographie par perméation de gel (★). La figure III-5 montre la fraction centrale qui a été prélevée pour

---

(★) Nous remercions M.J. LESEC qui s'est chargé de cette séparation.

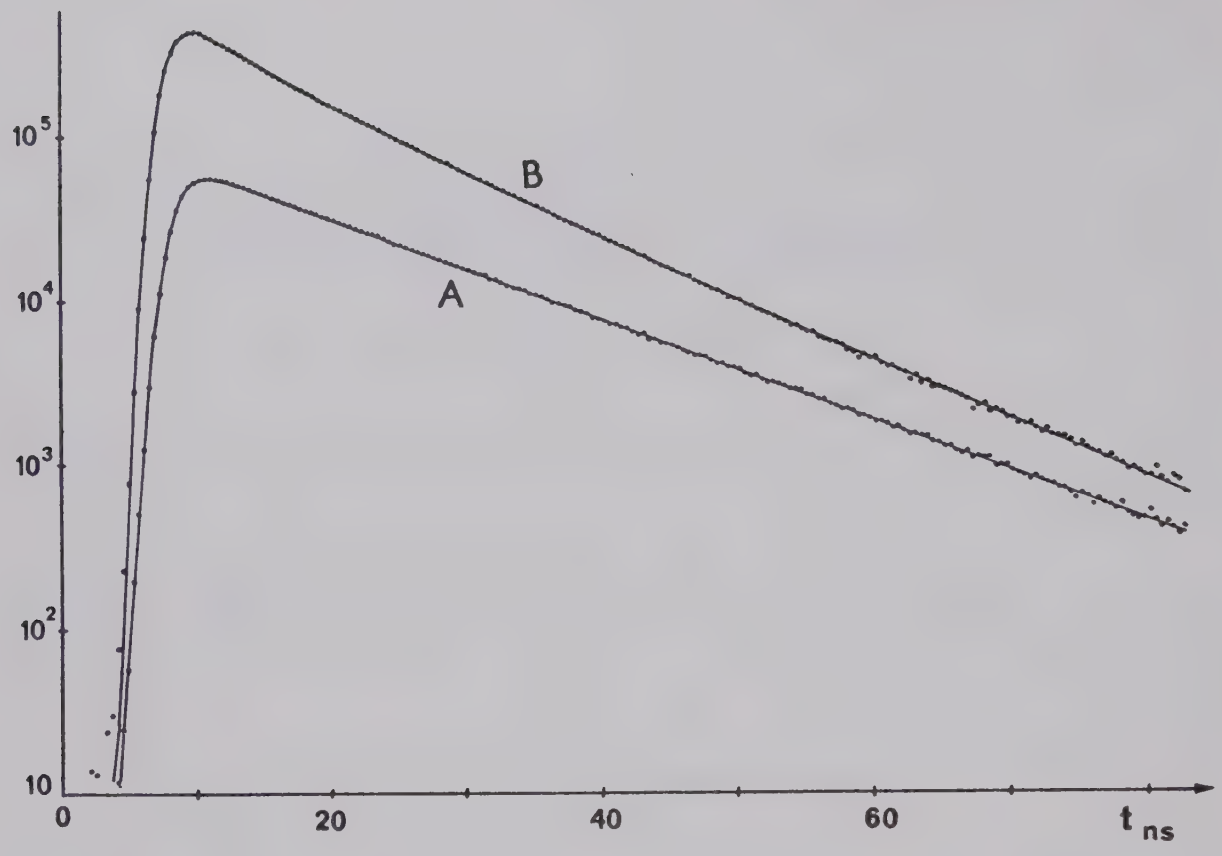


Fig. III-4 : Décroissance de l'intensité de fluorescence du diméthyl-9,10 anthracène (A) et du polystyrène PS-A (B) en solution dans le dichloro-1,2 éthane. Les courbes continues représentent la reconvolution de 1 exponentielle (A) et de 2 exponentielles (B) avec le flash.

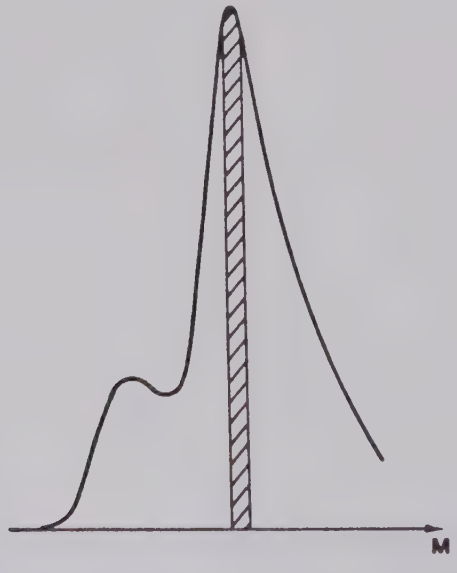


Fig. III-5 : Séparation quantitative du PS-A par GPC. La zone hachurée indique la zone correspondant au prélèvement.

la détermination de la durée de vie. La courbe de décroissance obtenue avec cette fraction et celle correspondant à un échantillon non fractionné sont parfaitement superposables. L'hypothèse avancée est donc à rejeter.

Une autre explication du phénomène peut être reliée à l'influence de l'environnement sur le fluorophore. En effet, l'existence d'une transition électronique dans celui-ci implique un moment de transition dipolaire qui polarise la cage de solvatation. Il est ainsi possible de relier les déplacements en longueur d'onde du spectre de fluorescence de l'anthracène à la polarisabilité du solvant [92]. L'influence de l'environnement sur le rendement quantique de l'anthracène (et sa durée de vie) peut-être interprétée de la même façon [93, 94]. On postule généralement qu'il se forme un faible complexe de transfert de charge entre le fluorophore et le solvant. La formation de ce complexe augmente le couplage spin-orbite du fluorophore, favorisant ainsi la formation du triplet aux dépends de la fluorescence. Dans notre cas, le noyau anthracène est bien inséré dans la chaîne et son environnement est constitué non seulement de molécules de solvant, mais aussi d'atomes de la chaîne qui lui sont adjacents. Les mouvements de ces derniers produisent des fluctuations d'environnement c'est-à-dire de polarisabilité. Il en résulte vraisemblablement une distribution de durées de vie $f(\tau)$; l'intensité peut alors s'écrire sous la forme

$$I(t) = I_o \int_o^\infty f(\tau)\, e^{-t/\tau}\, d\tau$$

$$\text{avec} \quad \int_o^\infty f(\tau)d\tau = 1$$

Le moment d'ordre 1 de $f(\tau)$ n'est autre que l'intégrale de $I(t)/I_o$:

$$m_1 = \int_o^\infty \tau f(\tau)d\tau = \frac{1}{I_o} \int_o^\infty I(t)dt$$

De la même façon, le moment d'ordre 2 est donné par :

$$m_2 = \int_o^\infty \tau^2 f(\tau)d\tau = \frac{1}{I_o} \int_o^\infty t\, I(t)dt$$

La courbe de décroissance de l'intensité (figure III-4B) peut être ajustée numériquement à l'aide d'une somme de deux exponentielles :

$$I(t) = A_1 \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$

Les paramètres de cette somme sont utilisés pour déterminer m_1 et m_2 :

$$m_1 = \frac{A_1T_1 + A_2T_2}{A_1 + A_2}$$

$$m_2 = \frac{A_1T_1^2 + A_2T_2^2}{A_1 + A_2}$$

m_1 représente la valeur moyenne de la distribution c'est-à-dire la durée de vie moyenne $< \tau >$, et la largeur de la distribution peut être caractérisée par la racine carrée du moment centré d'ordre 2, lequel est donné par :

$$\mu_2 = m_2 - m_1^2$$

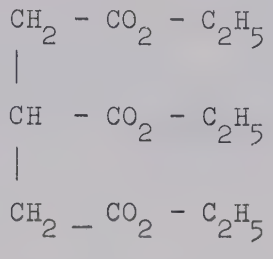
Le tableau III-2 rassemble les valeurs de $< \tau >$ et de $\sqrt{\mu_2}$ déterminées dans différents solvants.

Solvant	$< \tau >$ ns	$\sqrt{\mu_2}$ ns
Acétate d'éthyle	9,6	3,1
Méthyléthylcétone	10,1	3,3
Ethylbenzène	8,1	2,7
Benzène	8,0	2,3
Dichloro-1,2 éthane	9,0	3,0
Chloroforme	8,5	2,7

Tableau III-2 Influence du solvant sur la distribution des durées de vie.

III-4. MESURE DU DECLIN DE L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE.

Des mesures du déclin de l'anisotropie du polystyrène PS-A ont été effectuées à 25°C dans des mélanges de solvants de même nature chimique à savoir l'acétate d'éthyle et la tripropionine (★) (tripropionate de glycérol)



Les viscosités cinématiques des mélanges ont été mesurées sur l'appareil VISCOMATIC FICA à 25°C. La détermination parallèle des densités à cette température, à l'aide d'un picnomètre, a permis de calculer les viscosités dynamiques. Les résultats sont rassemblés sur le tableau III-3 et représentés sur la figure III-6.

Les concentrations en polymère étaient inférieures à 0,1% (ce qui correspond à une concentration en anthracène inférieure à 10^{-5}M). Il en sera de même dans toute la suite de ce travail. Les solutions n'ont pas été dégazées afin de ne pas modifier la composition du mélange de solvants; en effet, l'acétate d'éthyle est beaucoup plus volatil que la tripropionine.

(★) *La tripropionine (réf. FLUKA 93 230) a été purifiée par distillation sous vide.*

% tripropionine (en poids)	ν	d	$\eta = \nu d$ cp
0	0,479	0,895	0,43
20,0	0,644	0,93	0,60
39,7	0,923	0,96	0,89
60,1	1,50	0,998	1,50
79,6	2,77	1,04	2,88
89,6	4,11	1,06	4,35
100	6,92	1,08	7,47

Tableau III-3 : Viscosités des mélanges acétate d'éthyle-tripropionine à 25°C (ν : viscosité cinématique; d : densité; η : viscosité dynamique).

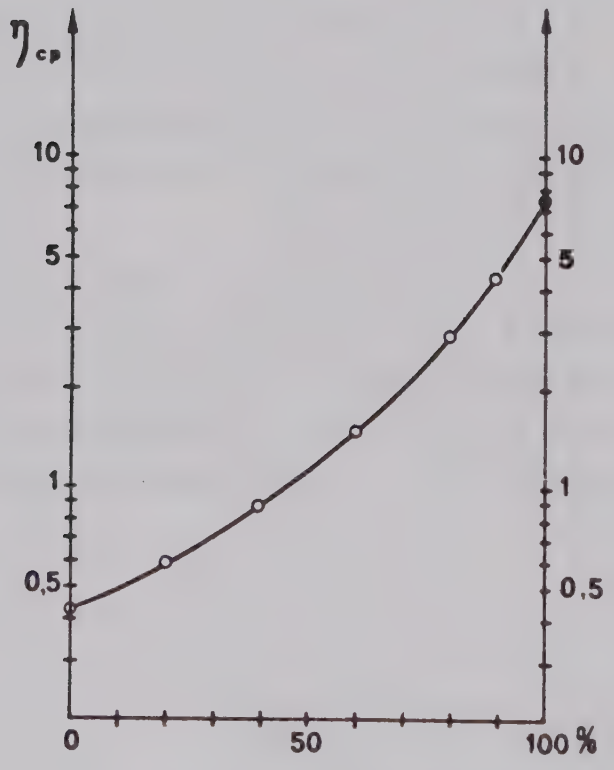


Fig. III-6 : Viscosité des mélanges acétate d'éthyle-tripropionine à 25°C.

III-4-1. Allure des courbes de déclin.

Des exemples des courbes $I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)$ et $I_{\parallel}(t) + 2\, I_{\perp}(t)$ sont donnés sur la figure III-7. La déconvolution des courbes par rapport au flash et l'ajustement numérique à l'aide d'une somme d'exponentielles ont été réalisés par la méthode des fonctions modulatrices (voir § II-2-2).

Il suffit de deux exponentielles pour obtenir un ajustement numérique satisfaisant. A partir des amplitudes et des constantes de temps de ces exponentielles (tableau III-4) (★), il est possible de construire les courbes représentatives de l'anisotropie d'émission (figure III-8) sans postuler a priori sa forme théorique. Compte tenu de la précision de la déconvolution et du bruit qui entâche les courbes expérimentales, nous avons représenté sur la figure III-8, les résultats par une zone hachurée correspondant à l'intervalle de confiance.

L'examen de cette figure montre que la fonction d'autocorrélation n'est pas une exponentielle simple et qu'en outre, le comportement aux temps longs n'est pas en $t^{-1/2}$ ce qui exclut une loi du type :

$$r(t) = r_o\, e^{t/\rho}\, \mathrm{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}} \qquad \text{(II-18)}$$

Par contre, il est possible de trouver un accord satisfaisant avec des fonctions du type :

$$r(t) = r_o\, e^{-t/\theta}\, e^{t/\rho}\, \mathrm{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}} \qquad \text{(II-20)}$$

Celles qui ont donné le meilleur accord ont été tracées en trait gras.

Cependant, des écarts sont observés aux temps très courts surtout pour les faibles viscosités. Trois raisons peuvent être invoquées pour

---

(★) Une légère augmentation de l'anisotropie fondamentale r_o est observée lorsque la viscosité augmente. Cette variation est compatible avec la relation proposée par JABLONSKI [102]

$$r_o = a - \frac{b}{\eta}$$

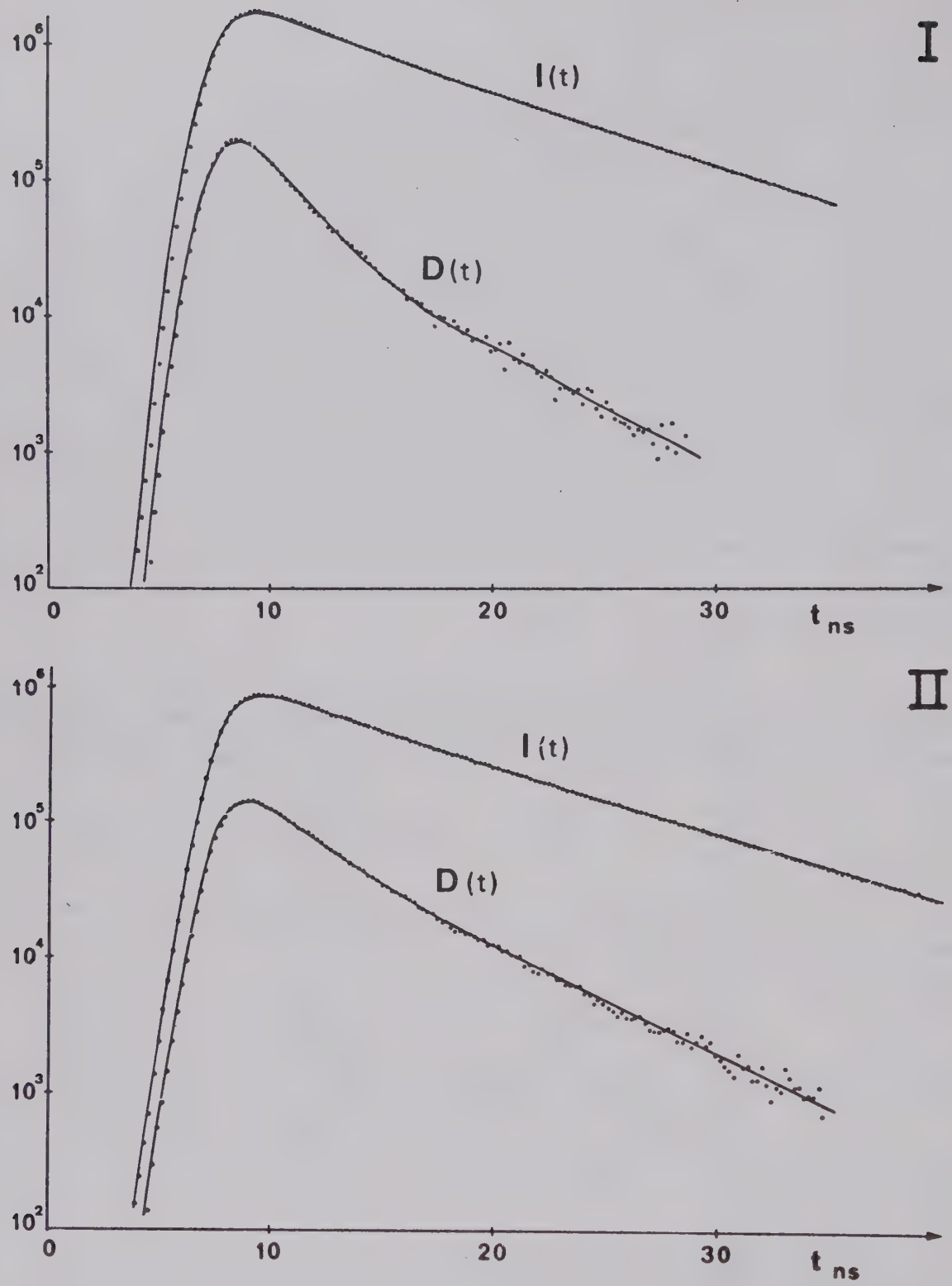


Fig. III-7 : Polystyrène PS-A dans des mélanges acétate d'éthyle-tripropionine. Courbes expérimentales (points) et reconvolution de la somme d'exponentielles avec le flash (courbe continue).

$$I(t) = I_{\parallel}(t) + 2\, I_{\perp}(t)$$

$$D(t) = I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)$$

I : viscosité 0,43 cp (acétate d'éthyle pure)

II : viscosité 1,50 cp

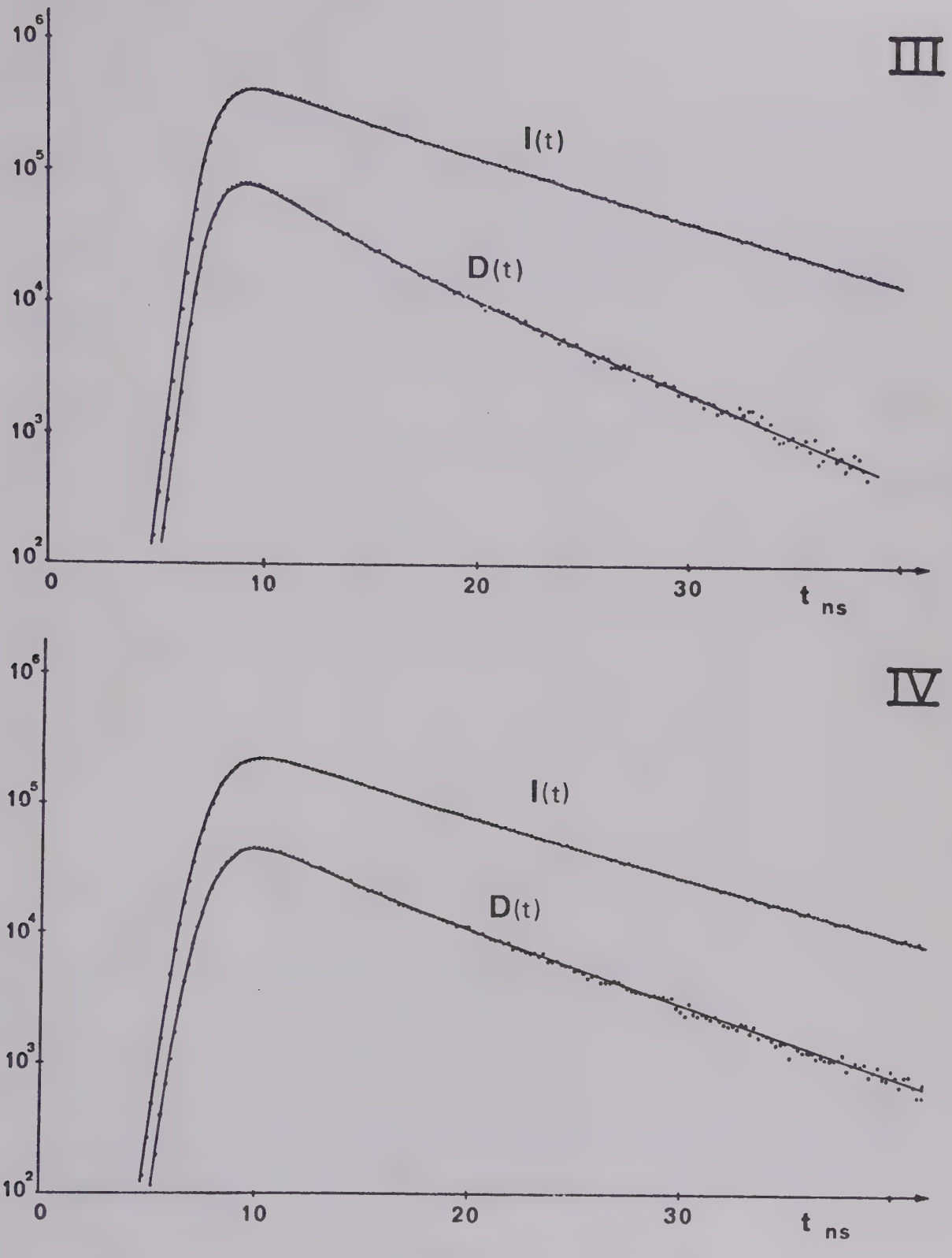


Fig. III-7 (suite) :

III viscosité 2,88 cp

IV viscosité 7,47 cp (tripropionine pure)

		Courbe $I_{\parallel} - I_{\perp}$				Courbe $I_{\parallel} + 2\,I_{\perp}$							
% Tripropionine	η cp	A_1	T_1 ns	A_2	T_2 ns	A'_1	T'_1 ns	A'_2	T'_2 ns	$\langle\tau\rangle$ ns	r_o	$\bar{r}$	$\langle\sigma\rangle$ ns
0	0,43	471	1,66	73	4,61	951	4,12	2040	8,09	6,83	0,182	0,055	3,9
39,7	0,89	202	2,20	63	5,03	635	5,52	697	9,45	7,57	0,198	0,075	6,0
60,1	1,50	161	2,28	101	5,34	412	4,86	799	9,36	7,83	0,216	0,095	8,3
79,6	2,88	109	3,21	71	6,64	270	5,20	535	9,69	8,18	0,223	0,124	14,5
89,6	4,35	103	3,24	107	6,95	290	4,99	625	9,78	8,26	0,230	0,143	19,5
100	7,47	53	4,03	64	7,87	266	6,59	258	10,9	8,71	0,224	0,157	30,0

Tableau III-4 - Polystyrène PS-A dans des mélanges acétate d'éthyle - tripropionine à 25°C

expliquer ces écarts.

1/ Les approximations faites dans la théorie limitent la validité de la relation (II-20) aux temps très courts.

2/ Bien que de faible encombrement, le noyau anthracène représente tout de même un accident dans la chaîne; le mouvement d'une liaison de la chaîne doit donc être moins bien reflété par le fluorophore aux temps très courts.

3/ La fonction de transfert de l'appareil déforme les courbes aux temps très courts (voir § II-2-1). Une correction des courbes à l'aide de cette fonction s'avère difficile, mais améliorerait de toute façon l'accord avec la théorie (★).

Afin de nous assurer que le terme préexponentiel $\exp(-t/\theta)$ n'est pas dû à une diffusion rotationnelle de l'ensemble de la macromolécule, le temps de relaxation correspondant a été calculé à l'aide de la relation de RISEMAN et KIRKWOOD [96] :

$$\tau_D = \frac{1}{6D_r} = \frac{2\,M\,\eta_o\,[\eta]}{3\,RT}$$

où M est la masse moléculaire
η_o la viscosité du solvant
$[\eta]$ la viscosité intrinsèque

En utilisant la valeur de $[\eta]$ du polymère en solution dans l'acétate d'éthyle (§ III-4-3), la valeur de τ_D est de 120 ns, alors que pour ce même système,

---

(★) Ce problème sera résolu lorsque l'on disposera de flashes plus courts (10 à 100 ps). De tels flashes existent actuellement mais leur cadence de répétition (∿ 1 Hz) ne permet pas d'opérer en photoélectron unique. Or, il est nécessaire d'utiliser cette méthode de façon à éliminer l'influence du temps de montée des photomultiplicateurs (0,8 ns pour les plus rapides).

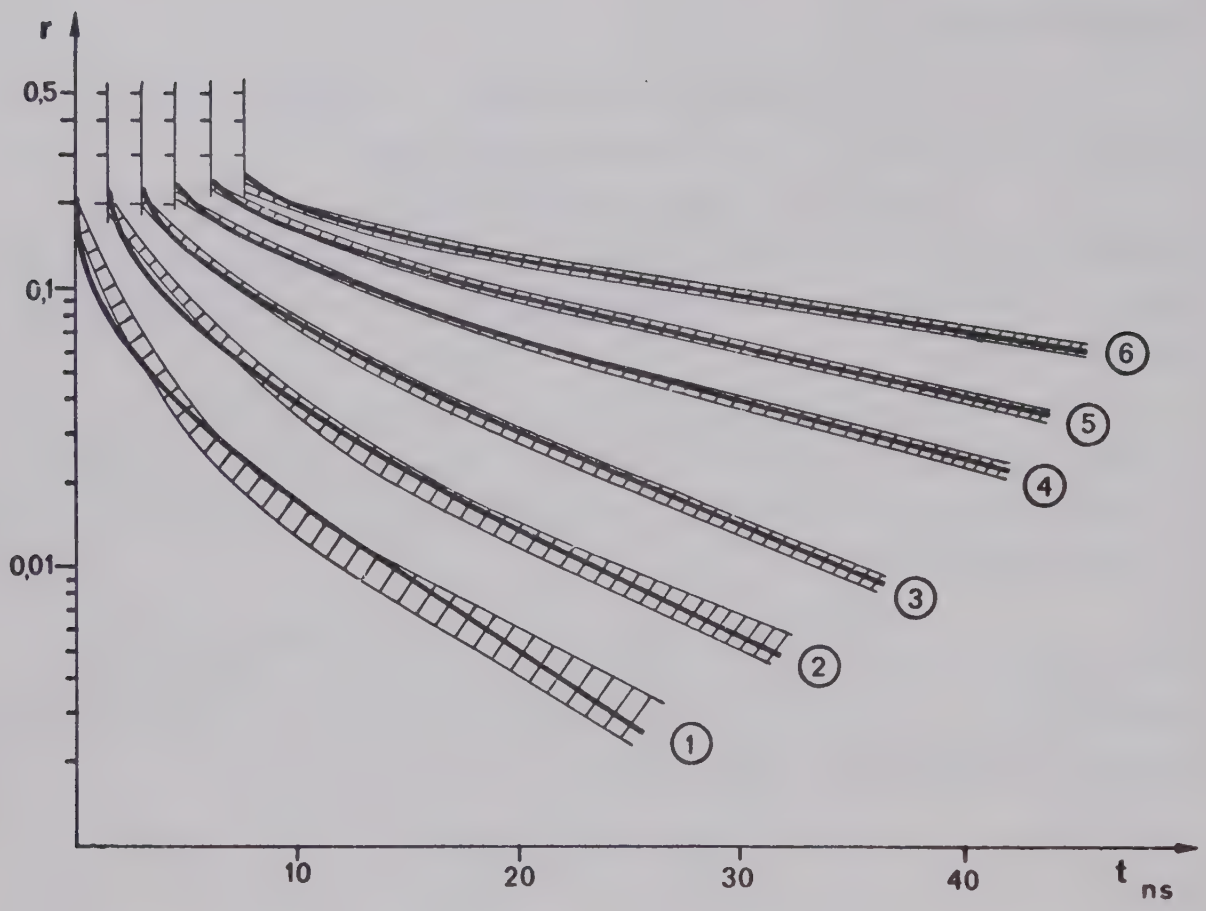


Fig. III-8 : Evolution de l'anisotropie au cours du temps dans divers mélanges acétate d'éthyle-tripropionine (PS-A). Les courbes théoriques sont tracées en trait gras. Pour permettre un meilleur examen, les courbes ont été décalées de 1,5 ns

Courbes n°	1	2	3	4	5	6
Viscosité (cp)	0,43	0,89	1,50	2,88	4,35	7,47

θ est seulement de l'ordre de 10 ns.

III-4-2. Influence de la viscosité.

L'utilisation de mélanges de solvants de même nature chimique permet d'étudier l'influence de la viscosité sans modifier sensiblement la conformation de la chaîne. Nous allons donc examiner les variations des temps de relaxation θ et ρ, et du temps de relaxation moyen $< \sigma >$ en fonction de la viscosité.

- Temps de relaxation θ et ρ

Les valeurs de θ, déterminées par l'analyse des courbes aux temps longs, sont représentées en fonction de la viscosité sur la figure III-9. Il semble que θ, temps de relaxation reflétant les effets des écarts par rapport au réseau diamant (voir I-5), varie selon une loi du type :

$$\theta = a + b\eta$$

La constante a pourrait provenir d'une part des angles de valence de la chaîne qui peuvent s'écarter de la valeur 109°28', d'autre part des angles de rotation interne qui peuvent être différents de 120°. Il s'agirait donc d'une constante intrinsèque ne dépendant que de la structure chimique de la chaîne. D'autre part, la constante b traduirait notamment la façon dont les fluctuations des positions d'équilibre trans ou gauche diminuent quand la viscosité augmente.

En ce qui concerne le temps de relaxation ρ relatif aux mouvements entraînant une diffusion de l'orientation des liaisons, il n'est pas possible de le déterminer correctement en raison des écarts observés aux temps très courts. Cependant, d'après la forme des courbes (figure III-8), le rapport θ/ρ est toujours supérieur à 1 et diminue lorsque la viscosité augmente. La forme de la fonction d'autocorrélation dépend donc de la viscosité.

Ces résultats, tout à fait originaux, montrent l'intérêt que présente la technique de décroissance pour analyser de façon fine les processus de relaxation.

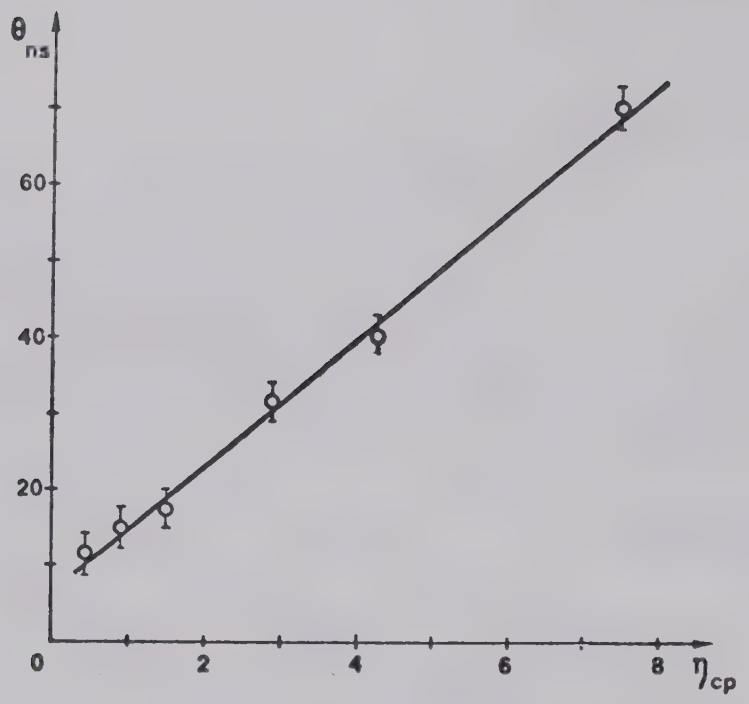


Fig. III-9 : Variations du temps de relaxation θ en fonction de la viscosité (PS - A).

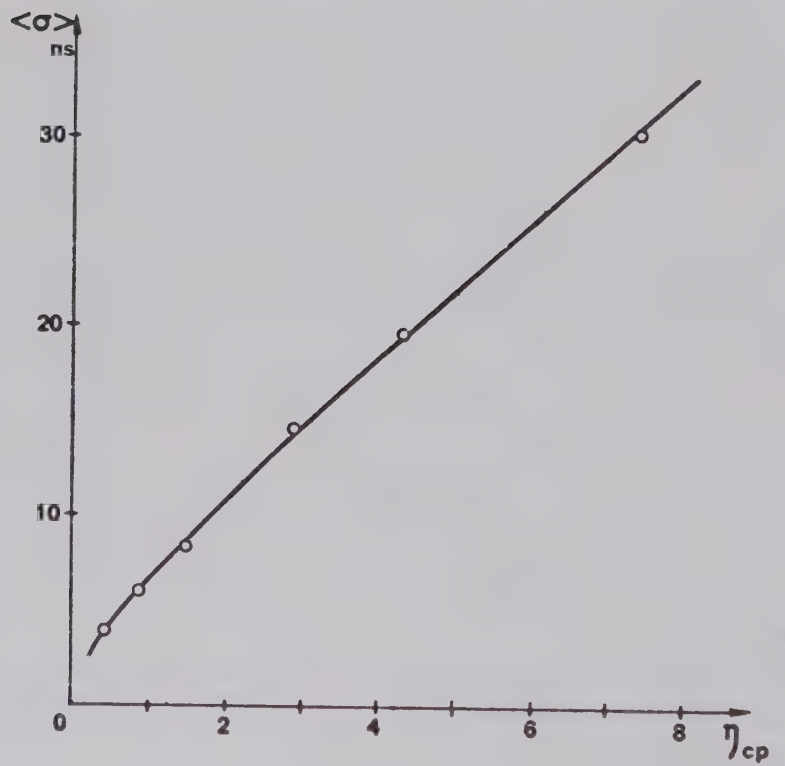


Fig. III-10 : Variations du temps de relaxation moyen $< \sigma >$ en fonction de la viscosité (PS - A).

- Temps de relaxation moyen

Si l'on considère la distribution des temps de relaxation, nous avons vu au paragraphe II-4-2 que le temps de relaxation moyen $< \sigma >$ de cette distribution pouvait être déterminé à partir des courbes de déclin par la relation :

$$< \sigma > = \frac{1}{r_o} \int_o^\infty r(t)dt$$

Cette expression peut être calculée à l'aide des constantes de temps et des amplitudes des exponentielles qui ont permis d'ajuster numériquement les courbes expérimentales (Tableau III-4) :

$$< \sigma > = \frac{\Sigma A'_i}{\Sigma A_i} \int_o^\infty \frac{\Sigma A_i \exp(- t/T_i)}{\Sigma A'_i \exp(- t/T'_i)} dt$$

Sur la figure III-10, les valeurs de $< \sigma >$ ainsi calculées ont été portées en fonction de la viscosité η. La variation est sensiblement linéaire mais une courbure est observée pour des viscosités inférieures à 1 cp.

BIDDLE et NORDSTRÖM [73] ont obtenu une courbe semblable avec un polystyrène possédant un groupement diphényl-9,10 anthracène fixé à la chaîne latéralement. Le temps de relaxation était déterminé dans divers solvants à l'aide de la relation de PERRIN (II-15). La variation du temps de relaxation moyen de ce même polymère, calculé à partir de nos courbes de déclin de l'anisotropie (voir chapitre III-6) a un comportement analogue.

BIDDLE et NORDSTRÖM ont interprété ce phénomène de la façon suivante. Les mouvements locaux subissent l'influence de la résistance visqueuse du solvant d'une part, et des barrières de rotation s'opposant aux changements conformationnels d'autre part. Ces deux effets agissent en parallèle, le temps de relaxation σ satisfait, selon ces auteurs, à une relation du type :

$$\sigma T = a \eta + b e^{E/RT}$$

où E désigne une énergie d'activation.

CERF [96] a donné une autre interprétation de la courbure

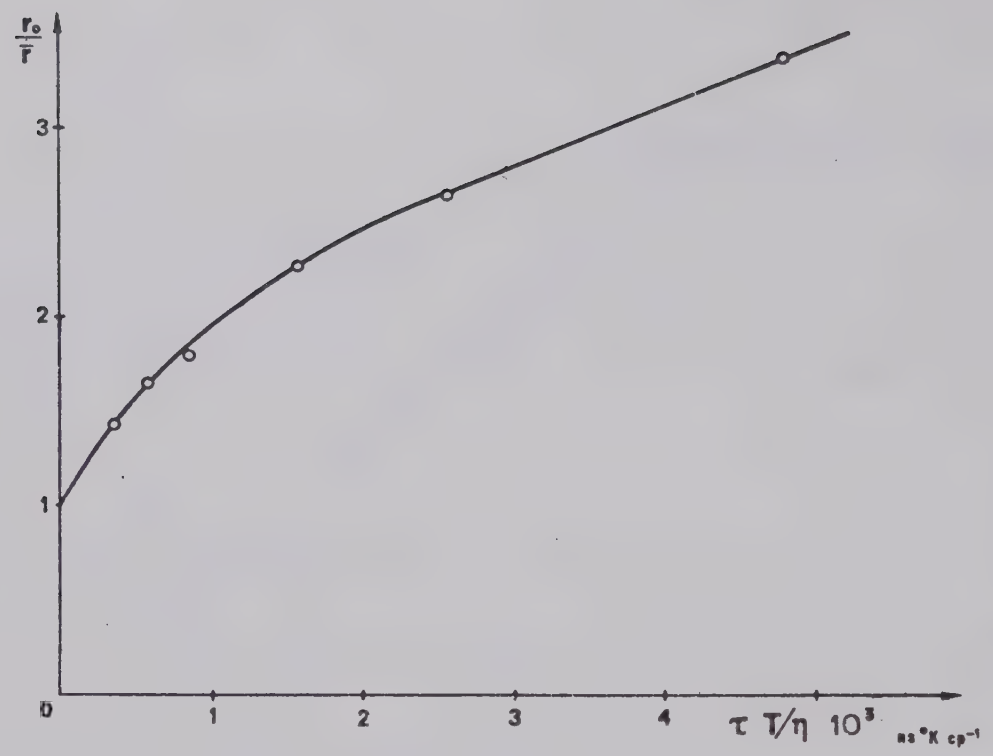


Fig. III-11 : Variations du rapport $r_o/\bar{r}$ en fonction de $\tau T/\eta$ (PS-A)

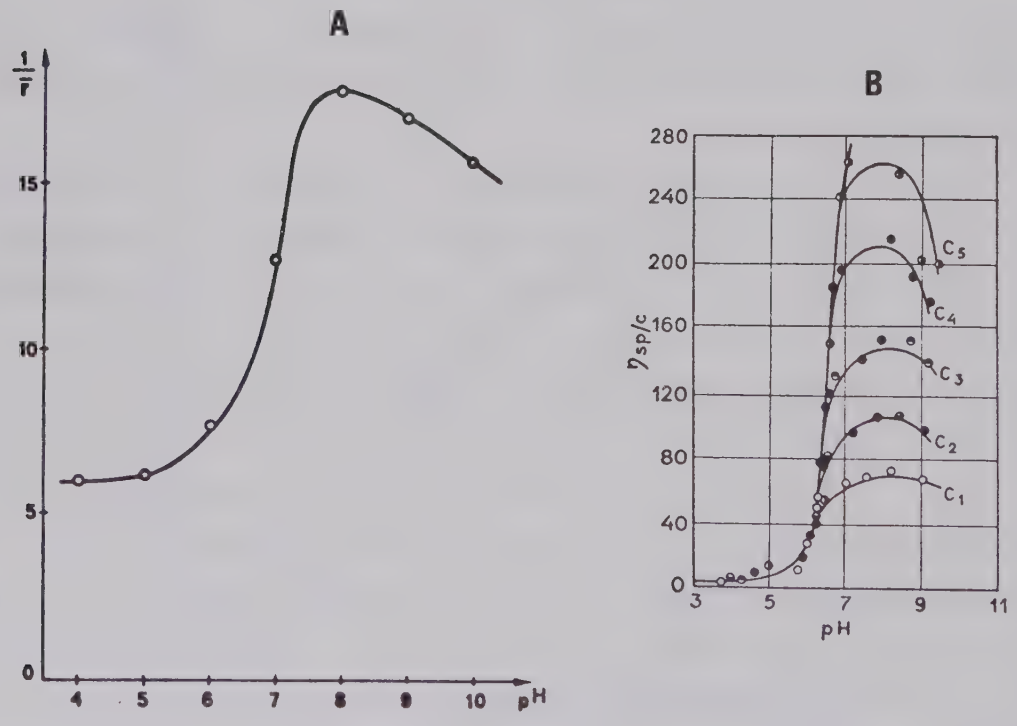


Fig. III-12 : Acide polyméthacrylique en solution aqueuse à 30°C.

A : variations de l'anisotropie moyenne en fonction du pH

B : variations du rapport viscosité spécifique/concentration en fonction du pH à diverses concentrations (d'après KATCHALSKY et EISENBERG [101]).

observée en distinguant deux classes de mouvements locaux. Dans le cas de fortes frictions, il s'agit de mouvements diffusifs dont les temps de relaxation doivent, d'après la théorie de KRAMERS [107], être proportionnels à la viscosité. En ce qui concerne les faibles frictions, les mouvements sont non-diffusifs et leurs temps de relaxation varient linéairement avec la viscosité avec un terme additif indépendant de celle-ci.

Il est à noter qu'un tel comportement a été observé dans le cas du polyoxyéthylène étudié par résonance magnétique nucléaire [97 - 99] et par résonance paramagnétique électronique [100].

- Anisotropie moyenne

La figure III-11 sur laquelle les valeurs du rapport $r_o/\bar{r}$ ont été représentées en fonction de $\tau T/\eta$, indique clairement qu'une loi du type PERRIN (II-14) ne convient pas.

III-4-3. Influence de la conformation de la chaîne

Afin d'étudier l'influence de la conformation de la chaîne sur son comportement dynamique, les courbes de déclin ont été enregistrées avec le polystyrène PS-A dans différents solvants.

Les facteurs d'expansion α de la chaîne ont été déterminés par l'intermédiaire des viscosités intrinsèques mesurées dans ces solvants et dans un solvant Θ :

$$\alpha^3 = \frac{[\eta]}{[\eta]_\Theta}$$

Les valeurs de α varient malheureusement dans un domaine restreint (1,03 à 1,25). L'allure des courbes de déclin est peu différente selon le solvant, et le temps de relaxation moyen $< \sigma >$ est peu affecté comme le montre le tableau III-5.

Solvant	η_{cp}	$[\eta]_{d\ell\ g^{-1}}$	α	$<\sigma>_{ns}$
Acétate d'éthyle	0,426	0,198	1,03	3,8
Méthyléthylcétone	0,398	0,202	1,04	3,3
Dichloro-1,2 éthane	0,804	0,275	1,15	4,3
Ethylbenzène	0,637	0,295	1,18	3,9
Chloroforme	0,550	0,328	1,22	3,8
Benzène	0,603	0,350	1,25	4,1

Tableau III-5. Influence du solvant sur le temps de relaxation moyen du polystyrène PS-A

En toute rigueur la comparaison doit être faite en réduisant les valeurs de $<\sigma>$ à même viscosité mais une telle réduction est délicate puisque $<\sigma>$ n'est pas strictement proportionnel à la viscosité. Cependant, en considérant les solvants relatifs aux valeurs extrêmes de α, à savoir l'acétate d'éthyle ($\alpha = 1,03$) et le benzène ($\alpha = 1,25$), les valeurs de $<\sigma>$ normées selon une loi supposée linéaire, à la même viscosité de 0,5 cp, sont respectivement 4,5 ns et 3,4 ns. Ceci révèle une relaxation plus rapide lorsque le facteur d'expansion est plus grand; il existe en effet dans ce cas moins d'empêchements de rotation dus aux repliements de la chaîne.

Avec d'autres polymères tels que le polyméthacrylate de méthyle [81] , le polyoxyéthylène [83] , le même effet a été observé.

Récemment, BULLOCK et coll. [108] ont montré par résonance paramagnétique électronique, que le temps de corrélation du polystyrène était plus long dans un mauvais solvant que dans un bon solvant au sens thermodynamique.

Dans un travail antérieur [79] , nous avions déjà étudié l'influence de la conformation de l'acide polyméthacrylique sur sa flexi-

-bilité en opérant non pas dans divers solvants, mais à divers taux de neutralisation. Celle-ci provoque en effet, une extension importante de la chaîne. Le fluorophore, l'amino-9 acridine, était fixé sur la chaîne latérale.

Une très grande similitude est observée pour les variations de $1/\overline{r}$ et de la viscosité intrinsèque en fonction du pH (figure III-12).

Cette expérience, malgré son caractère qualitatif, confirme le fait que la flexibilité d'une chaîne augmente lorsque sa conformation moyenne est plus étendue.

III-5. MESURES COUPLEES D'INHIBITION ET DE POLARISATION DE FLUORESCENCE.

La méthode consiste à ajouter un inhibiteur du fluorophore directement dans la cuve de mesure à l'aide de micropipettes. On peut suivre ainsi les variations de l'anisotropie moyenne en fonction de l'intensité de fluorescence. Si celle-ci est proportionnelle à la durée de vie du fluorophore, cette technique permet de tester les relations précédemment établies :

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \frac{3\,\tau}{\rho}\right) \qquad \text{(II-15)}$$

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left(1 + \sqrt{\frac{\tau}{\rho}}\right) \qquad \text{(II-19)}$$

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left[1 + \frac{\tau}{\theta} + \sqrt{\frac{\tau}{\rho}\left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right)}\right] \qquad \text{(II-21)}$$

Ces relations supposent que l'intensité décroît selon une exponentielle simple :

$$I = I_o\, e^{-t/\tau}$$

Or, dans le cas du polymère considéré, une distribution de durée de vie a été observée. Cependant les écarts par rapport à une décroissance purement exponeutielle sont suffisamment faibles pour que, en première approximation, les relations précédentes puissent être utilisées en remplaçant τ par la durée de vie moyenne définie au paragraphe III-3-2.

L'inhibiteur utilisé est le tétrachlorure de carbone. Le chloroforme et le dichloro-1,2 éthane ont été choisis comme solvants en raison, d'une part de leur similitude de nature chimique avec le tétrachlorure de carbone, d'autre part des viscosités comparables de ces trois composés. Il est ainsi possible d'ajouter le tétrachlorure de carbone en quantité non négligeable tout en limitant les modifications de comportement de la chaîne.

Les solutions n'ont pas été dégazées car il est difficile d'ajouter l'inhibiteur sans introduire de l'oxygène qui est lui-même un inhibiteur. Ceci n'est pas gênant puisque la différence de durée de vie entre la solution dégazée et celle qui est en équilibre avec l'oxygène de l'air est reproductible.

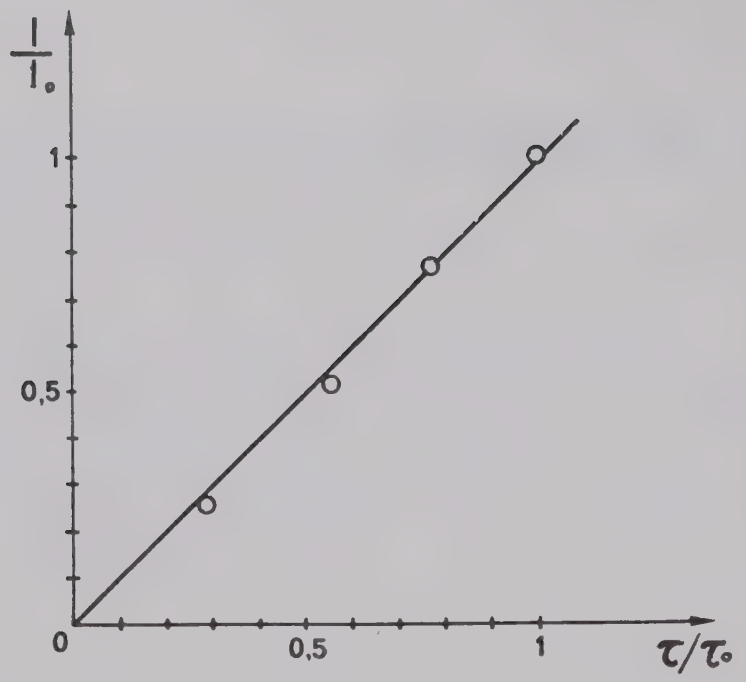


Fig. III-13 : Variations de l'intensité de fluorescence du polystyrène PS-A en solution dans le dichloro-1,2 éthane en fonction de la durée de vie, à divers taux d'inhibition par CCl_4.

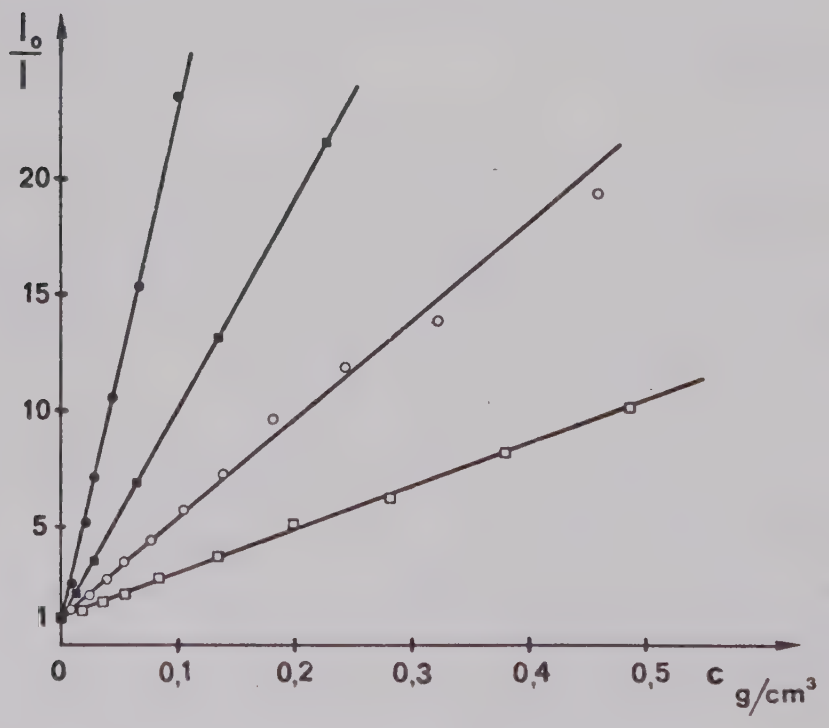


Fig. III-14 : Variations du rapport I_o/I en fonction de la concentration en inhibiteur :

○ polystyrène PS-A en solution dans le dichloro-1,2 éthane
□ " " " chloroforme
● diméthyl-9,10 anthracène en solution dans le dichloro-1,2 éthane
■ " " " chloroforme

Nous avons d'abord contrôlé que la durée de vie moyenne restait proportionnelle à l'intensité de fluorescence à divers taux d'inhibition. La figure III-13 révèle effectivement un comportement linéaire de I/I_o en fonction de τ/τ_o, I_o et τ_o étant les valeurs en l'absence de tétrachlorure de carbone.

Les composantes $I_{\parallel}$ et $I_{\perp}$ de la fluorescence sont mesurées à divers taux d'inhibition , à 23°C, sur l'appareil décrit au paragraphe II-1. Les filtres d'excitation et d'analyse sont respectivement CORNING 5840 et BALZERS K-2. L'intensité est déterminée à l'aide de la relation

$$I = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$$

La figure III-14 montre que le rapport I_o/I croît linéairement avec la concentration $[Q]$ en inhibiteur aussi bien pour le diméthyl-9,10 anthracène que pour le polymère. La loi de STERN-VOLMER

$$\frac{I_o}{I} = 1 + k\,\tau_o\,[Q]$$

est donc vérifiée et les valeurs de τ_o et de k sont reportées dans le tableau III-6. Il apparait que les constantes k de STERN-VOLMER sont plus grandes pour le fluorophore libre que pour le fluorophore inséré dans la chaîne. En effet, l'inhibition étant ici un mécanisme de chocs bimoléculaires, les effets d'empêchement stérique et de diffusion modifient l'efficacité de l'inhibition.

Composé	Solvant	τ_o ns	$k \times 10^{-9}$ $\ell\ mole^{-1}\ s^{-1}$
Diméthyl-9,10 anthracène	Chloroforme	8,1	1,7
" "	Dichloro-1,2 éthane	10,1	3,3
Polystyrène PS-A	Chloroforme	6,7	0,44
"	Dichloro-1,2 éthane	7,3	0,90

Tableau III-6

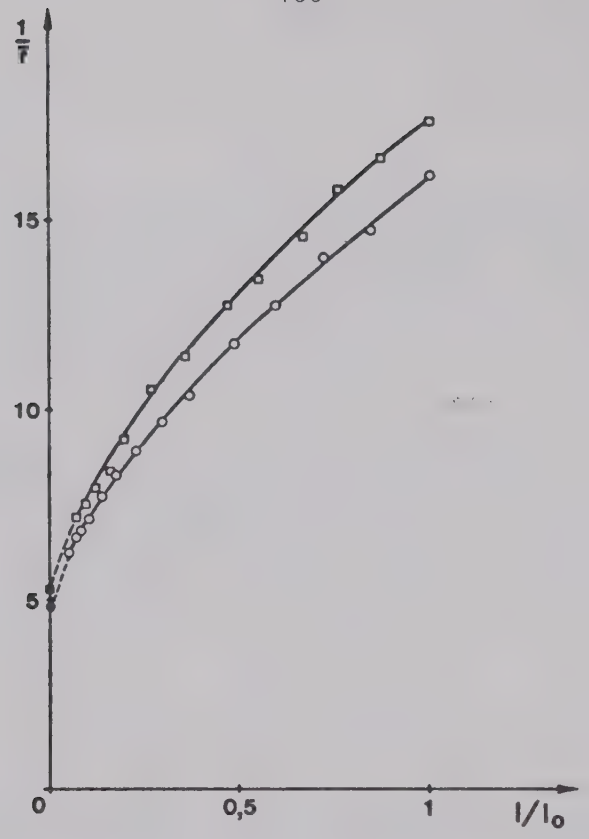


Fig. III-15 : Variations de $1/\overline{r}$ en fonction de I/I_o (PS-A)

○ solution dans le dichloro-1,2 éthane

□ solution dans le chloroforme

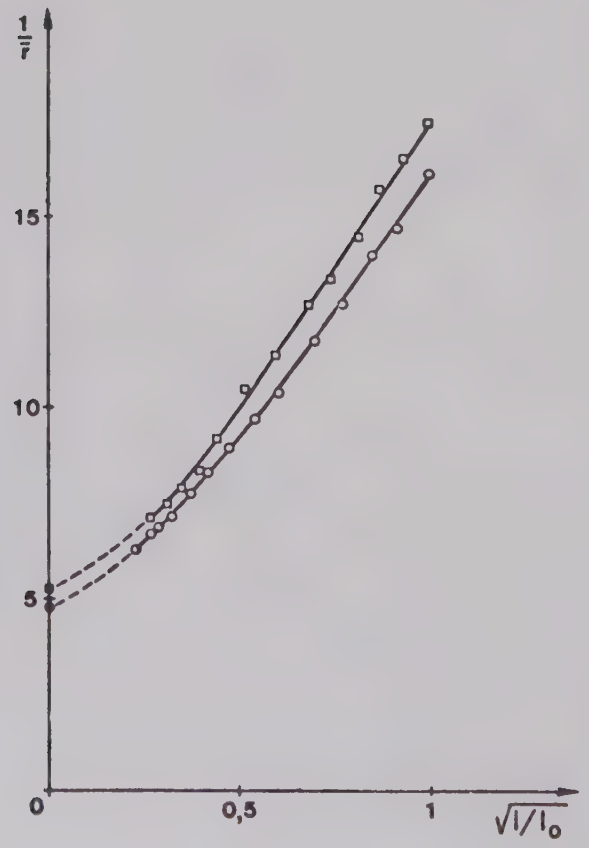


Fig. III-16 : Variations de $1/\overline{r}$ en fonction de $\sqrt{I/I_o}$ (PS-A)

○ solution dans le dichloro-1,2 éthane

□ solution dans le chloroforme

Sur la figure III-15, les variations de $1/\bar{r}$ ont été représentées en fonction de I/I_o, et sur la figure III-16 en fonction de $\sqrt{I/I_o}$. Les valeurs de $1/r_o$ qui y sont portées ont été déterminées au paragraphe précédent. Les résultats montrent que le comportement n'obéit ni à une loi linéaire en I/I_o, c'est-à-dire en τ (relation II-15) ni en $\sqrt{\tau}$ (relation II-19).

Par contre la figure III-17, révèle que, compte tenu de la marge d'erreur des points expérimentaux, l'accord avec une relation du type

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o}\left[1 + \frac{\tau}{\theta} + \sqrt{\frac{\tau}{\rho}\left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right)}\right] \qquad \text{(II-21)}$$

est satisfaisant, ce qui confirme les résultats obtenus par la technique de décroissance. En légende de ces figures, les valeurs de θ et ρ correspondant aux courbes théoriques donnant le meilleur accord, sont indiquées. Il faut cependant remarquer que d'autres couples (θ,ρ) notablement différents ont donné des courbes très voisines. Cette difficulté est inhérente à la forme de la relation II-21.

Comme nous l'avons indiqué au paragraphe II-4-3; les mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence permettent de déterminer le temps de relaxation moyen $\langle \sigma \rangle$, si les valeurs de r_o et de τ sont connues par ailleurs :

$$\langle \sigma \rangle = \lim_{\tau \to \infty} \frac{\bar{r}\tau}{r_o}$$

Sur la figure III-18, les valeurs de $1/\bar{r}\tau$ ont été portées en fonction de $1/\tau$. L'extrapolation à $1/\tau = 0$ conduit aux valeurs $\langle \sigma \rangle = 4{,}3$ ns et 3,7 ns pour les solutions dans le dichloro-1,2 éthane et le chloroforme respectivement; ces valeurs sont en excellent accord avec celles obtenues par la méthode de décroissance, à savoir 4,2 et 3,8 ns.

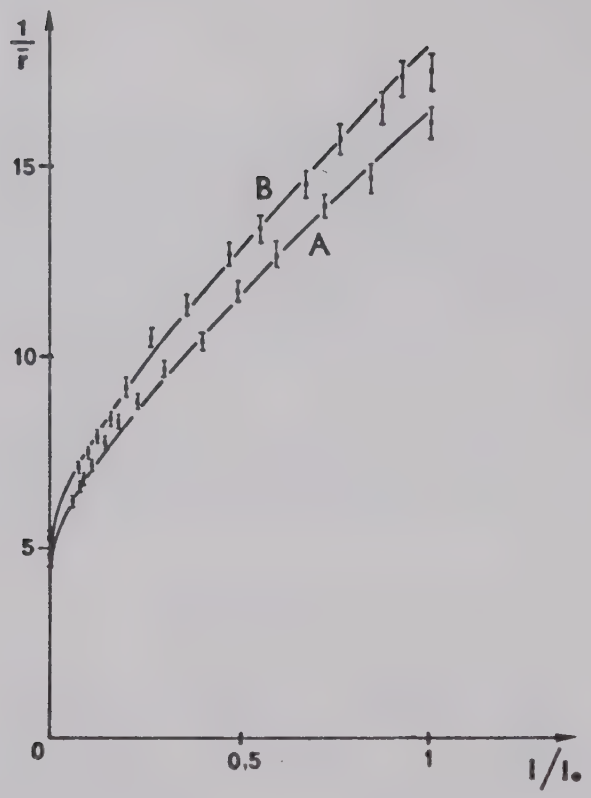


Fig. III-17 : Variations de $1/\bar{r}$ en fonction de $1/I_o$ (PS-A)
A : solution dans le dichloro-1,2 éthane
B : solution dans le chloroforme

Les courbes en trait plein correspondent à des fonctions du type II-21 avec les valeurs suivantes :

A :	θ = 10 ns	ρ = 3,5 ns	$1/r_o$ = 4,5	τ_o = 7,3 ns
B :	θ = 9 ns	ρ = 3 ns	$1/r_o$ = 4,9	τ_o = 6,7 ns

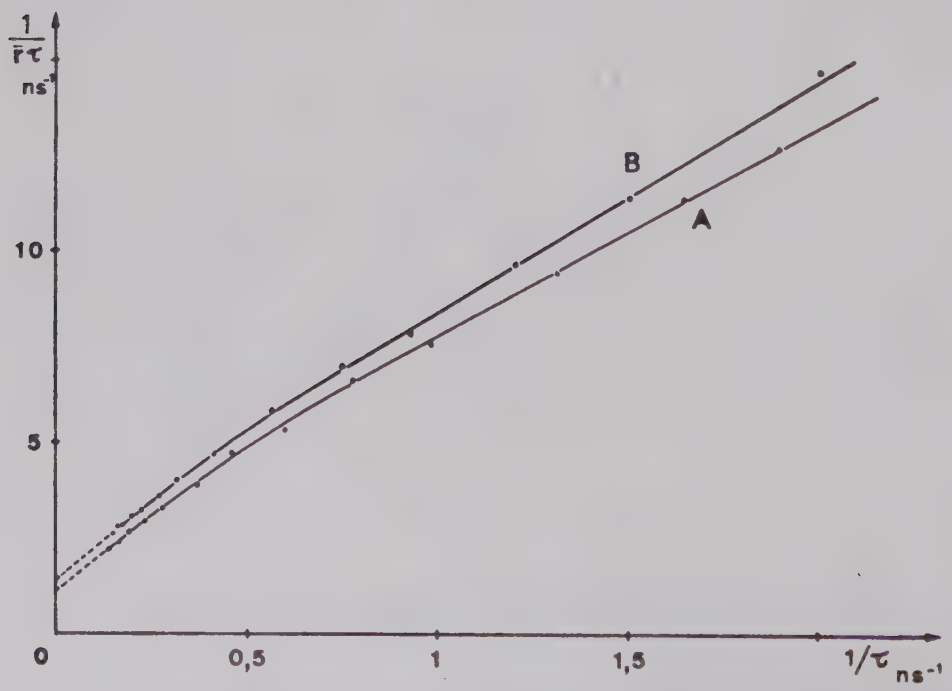
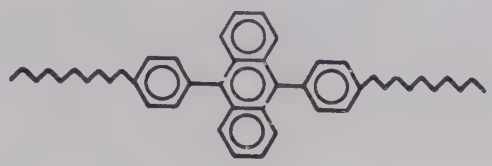


Fig. III-18 : Détermination du temps de relaxation moyen par extrapolation à $1/\tau = 0$ de la courbe $1/\bar{r}\ \tau = f(1/\tau)$.(PS-A)

Les mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence confirment donc les résultats obtenus à partir des courbes de déclin.

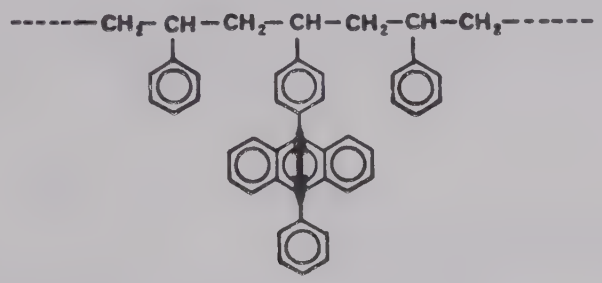
Remarque : G. WEILL nous a fait part très récemment des travaux effectués sous sa direction, par BENTZ [109] , sur un polystyrène contenant un groupement diphényl-9,10 anthracène inséré dans la chaîne.



La courbe $I/\overline{r} = f(I/I_o)$ présente, dans ce cas, une forme identique à celle que nous avons obtenue.

III-6. COMPARAISON AVEC UN POLYSTYRENE POSSEDANT UN FLUOROPHORE FIXE LATERALEMENT A LA CHAINE.

Il est intéressant de comparer le comportement du polystyrène que nous venons d'étudier (désigné par PS-A) avec celui d'un polystyrène possédant un fluorophore fixé latéralement à la chaîne et dont le moment de transition est perpendiculaire à celle-ci. C'est le cas du copolymère statistique de styrène et de styryl-9 phényl-10 anthracène (★) dont la structure est la suivante



La double flèche indique la direction commune des moments de transition d'absorption et d'émission pour le premier état singulet.

Le théorie exposée dans ce travail suppose que le moment de transition est dirigé selon une liaison de la chaîne et ne s'applique donc plus strictement au cas du polymère ci-dessus (désigné par PS-DPA) dont le moment de transition est dirigé selon une liaison latérale. Une analyse théorique détaillée s'avère délicate, mais on peut néanmoins remarquer

---

(★) Nous remercions M. Guy MEYER de l'Ecole d'Application des Hauts Polymères d'avoir bien voulu nous fournir ce copolymère dont la masse est 120.000 et qui contient 0,2 % de motifs diphényl-9,10 anthracène.

qu'une liaison latérale est solidaire de deux liaisons de la chaîne principale de sorte qu'elle est soumise à la fois aux mouvements de l'une et de l'autre. Par conséquent, il est possible de prévoir une relaxation plus rapide que celle d'une liaison de la chaîne principale. De plus, en raison des écarts possibles par rapport au réseau diamant, la fonction d'autocorrélation doit avoir un comportement sensiblement exponentiel aux temps longs.

Nous avons entrepris l'étude du polystyrène PS-DPA en conservant strictement les mêmes conditions opératoires que précédemment.

III-6-1. Mesure du déclin de l'anisotropie de fluorescence

WAHL et coll. [62] ont déjà étudié ce polymère par la technique de décroissance dans des mélanges chlorobenzène-pyralène, mais en raison du caractère arbitraire du dépouillement de leurs résultats (★), il nous a semblé préférable de faire d'autres expériences et de les analyser comme précédemment.

- Allure des courbes de déclin.

Les courbes de déclin ont été enregistrées dans des mélanges acétate d'éthyle-tripropionine à 25°C. Des exemples sont donnés sur la figure III-19.

La décroissance de l'intensité $I(t) = I_{\parallel}(t) + 2\, I_{\perp}(t)$ s'est avérée purement exponentielle; il est d'ailleurs logique que dans ce cas, les fluctuations d'environnement du fluorophore dues aux mouvements des liaisons adjacentes de la chaîne, soient beaucoup plus faibles que pour un fluorophore inséré dans la chaîne.

Les résultats de l'analyse des courbes sont reportés dans

(★) Ces auteurs imposent a priori la fonction d'autocorrélation sous la forme d'une somme de deux exponentielles dont les amplitudes sont fixées à 0,75 et 0,25.

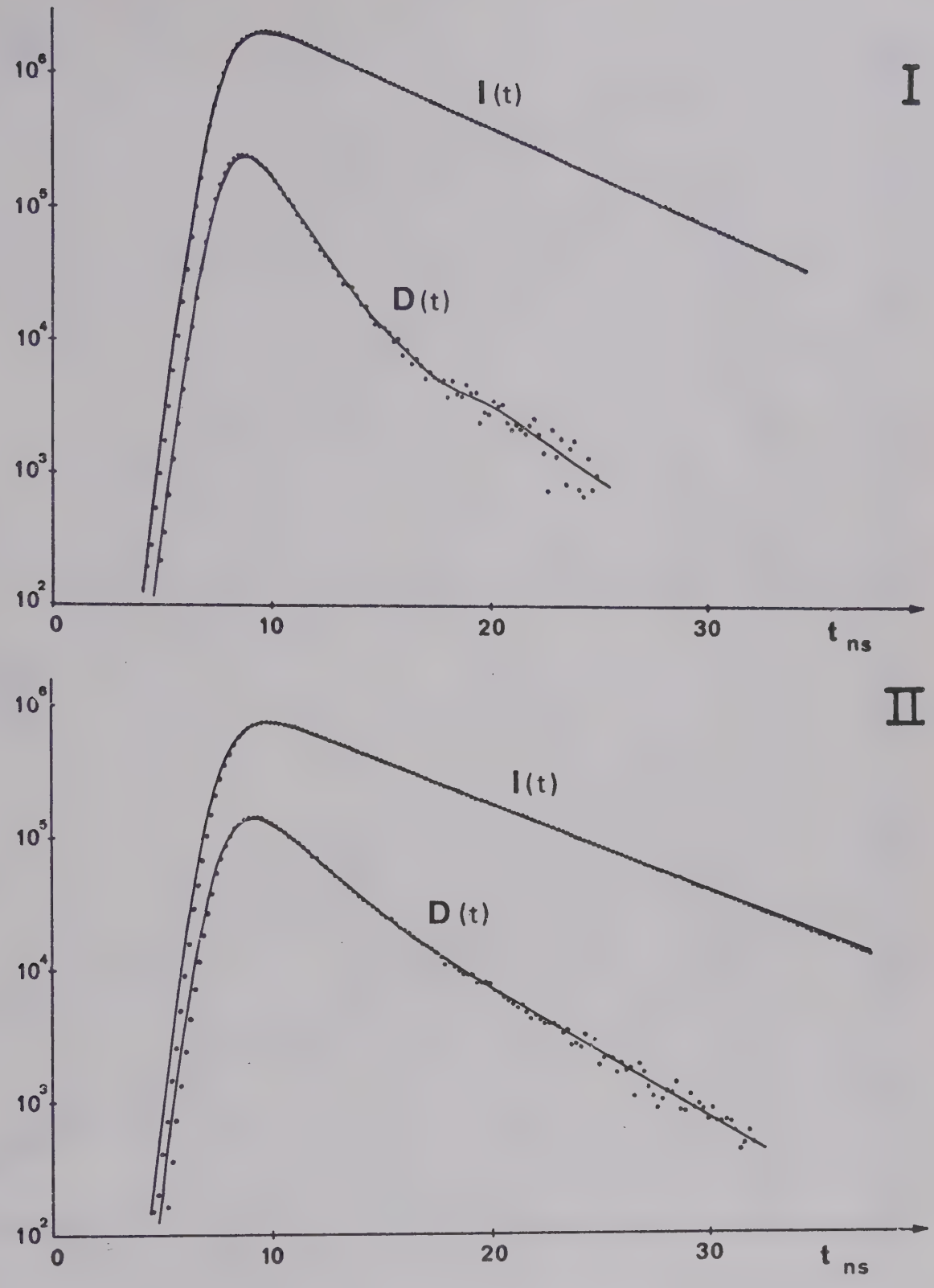


Fig. III-19 : Polystyrène PS-DPA dans des mélanges acétate d'éthyle-tripropionine. Courbes expérimentales (points) et reconvolution de la somme d'exponentielles avec le flash (courbe continue)

$$I(t) = I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)$$
$$D(t) = I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)$$

I : viscosité 0,43 cp (acétate d'éthyle pure)
II : viscosité 1,50 cp

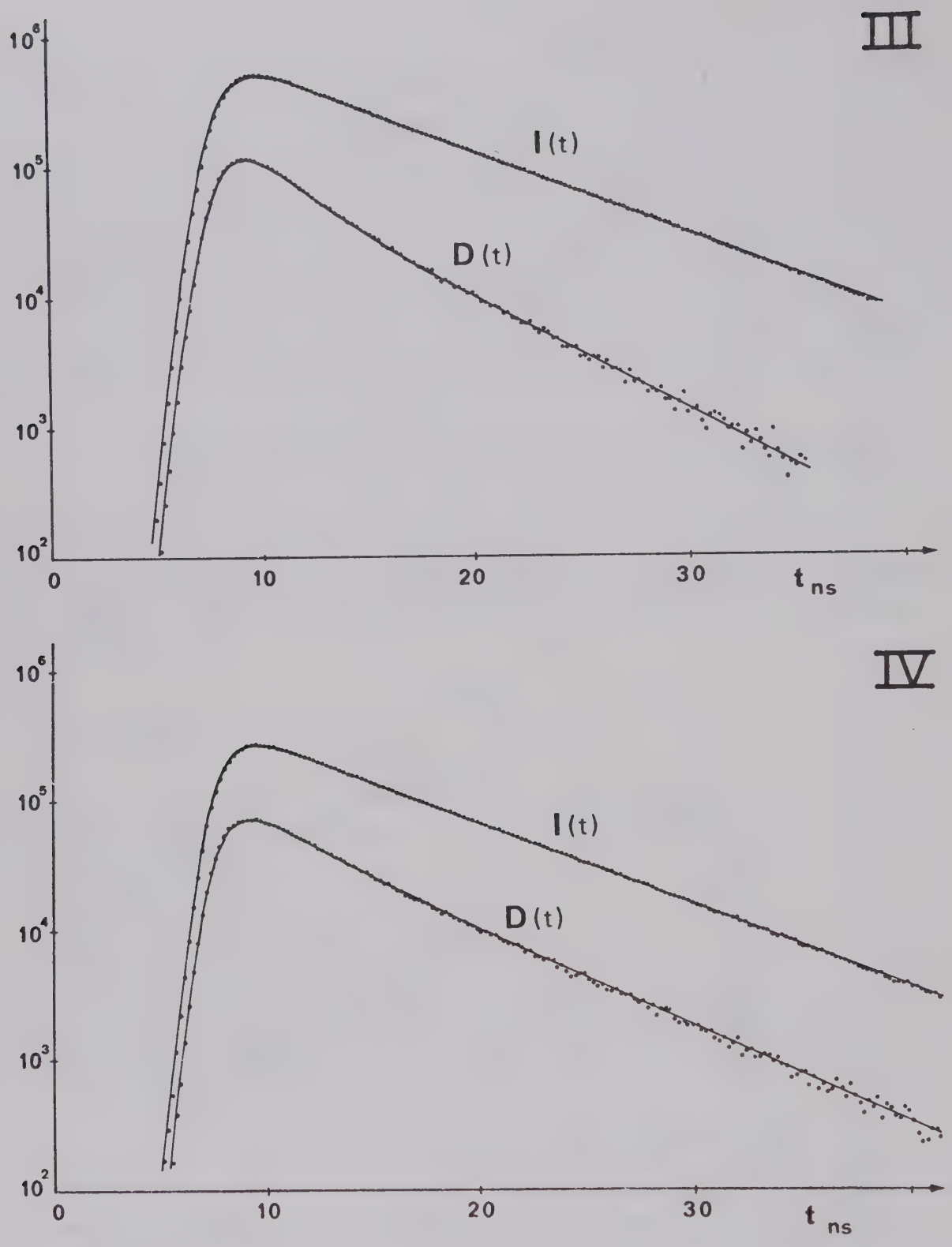


Fig. III-19 (suite)

III : viscosité 2,88 cp
IV : viscosité 7,47 cp (tripropionine pure).

		Courbe $I_{\parallel} - I_{\perp}$				Courbe $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$				
% tripropionine	η_{cp}	A_1	T_1 ns	A_2	T_2 ns	A'_1	$T'_1 = \tau$ ns	r_o	$\bar{r}$	$<\sigma>$ ns
0	0,43	1204	1,15	162	2,93	6199	5,63	0,223	0,053	2,1
39,7	0,89	1025	1,62	275	3,66	5294	6,04	0,250	0,083	3,8
60,1	1,50	652	1,97	365	4,05	3966	6,28	0,261	0,111	5,9
79,6	2,88	413	2,28	391	4,68	2848	6,49	0,285	0,150	9,9
90	4,40	342	2,93	277	5,51	2132	6,53	0,293	0,181	17,2
100	7,47	236	3,48	227	5,98	1571	6,62	0,297	0,209	23,6

Tableau III-7. Polystyrène PS-DPA dans des mélanges acétate d'éthyle-tripropionine à 25°C

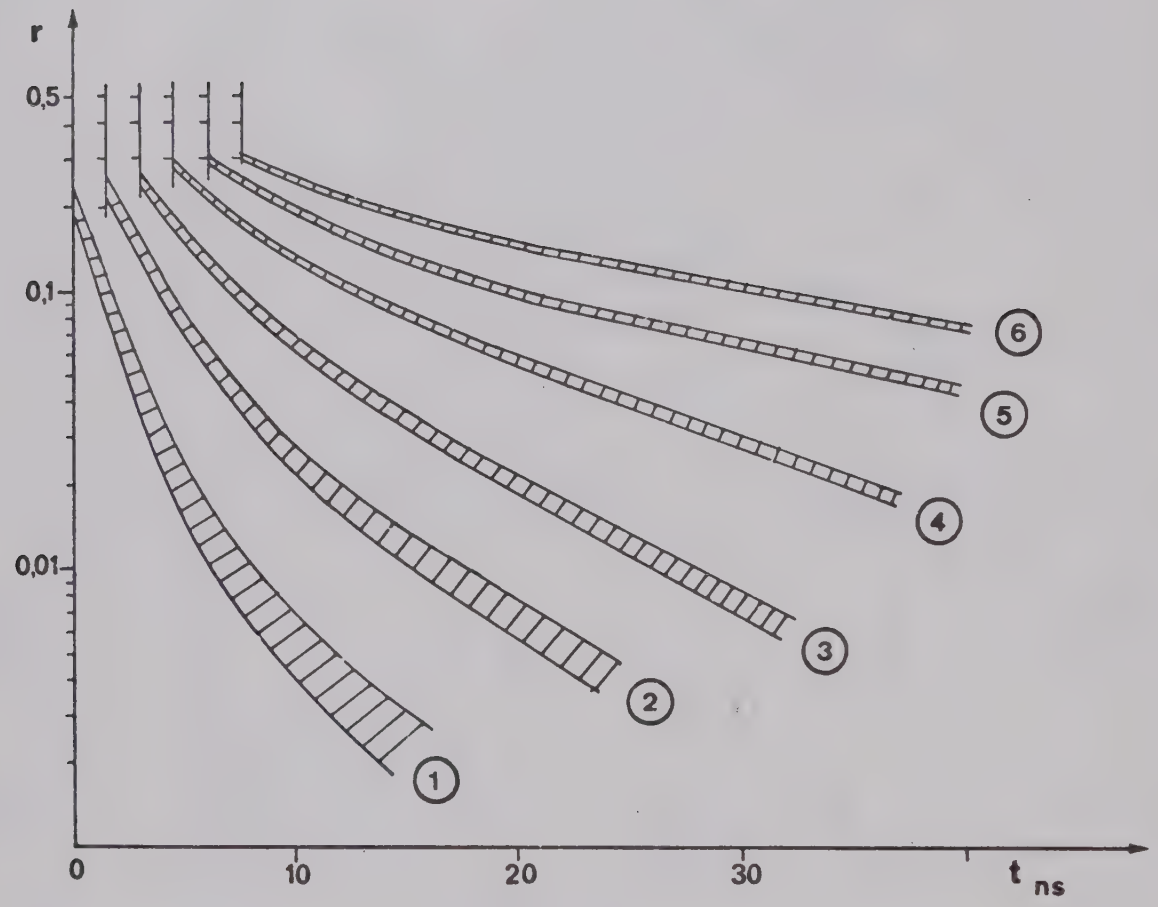


Fig. III-20 : Evolution de l'anisotropie au cours du temps dans divers mélanges acétate d'éthyle-tripropionine (PS-DPA).
Pour permettre un meilleur examen, les courbes ont été décalées de 1,5 ns.

Courbes n°	1	2	3	4	5	6
Viscosité (cp)	0,43	0,89	1,50	2,88	4,40	7,47

le tableau III-7. Les courbes r(t) ont été tracées avec leur intervalle de confiance sur la figure III-20.

La comparaison des figures III-8 et III-20 montre que la relaxation observée pour le polystyrène PS-DPA est, comme il était prévisible, plus rapide que celle du polystyrène PS-A à viscosité égale.

Un ajustement numérique des courbes r(t) du polystyrène PS-DPA à l'aide d'une fonction du type :

$$r(t) = r_o \, e^{-t/\theta} \, e^{t/\rho} \, \mathrm{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}}$$

s'est avéré beaucoup moins satisfaisant que précédemment, bien que le comportement aux temps longs soit également voisin d'une exponentielle.

- Influence de la viscosité.

Si l'on décompose les courbes r(t) en deux exponentielles, les amplitudes relatives de celles-ci varient avec la viscosité, contrairement aux résultats de WAHL et coll. [62] .

La figure III-21 représentant les variations du temps de relaxation moyen $< \sigma >$ en fonction de la viscosité présente une concavité aux faibles viscosités nettement moins accentuée qu'avec le polystyrène PS-A. Il en est de même pour la courbe $r_o/\bar{r} = f(\tau\, T/\eta)$ (figure III-22).

III-6-2. Mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence.

Comme l'indique la figure III-23 la loi de STERN-VOLMER est vérifiée. Les constantes de STERN-VOLMER sont respectivement $1{,}0.10^9$ et $0{,}52.10^9$ ℓ mole^{-1} s^{-1} pour les solutions dans le dichloro-1,2 éthane et le chloroforme et les durées de vie en l'absence d'inhibiteur, sont égales à 6,0 ns et 5,8 ns respectivement.

La variation de $1/\bar{r}$ en fonction de I/I_o (figure III-24) est presque linéaire ce qui confirme le résultat obtenu par WEILL [69]. Cependant une légère courbure est observée pour les faibles valeurs de I/I_o.

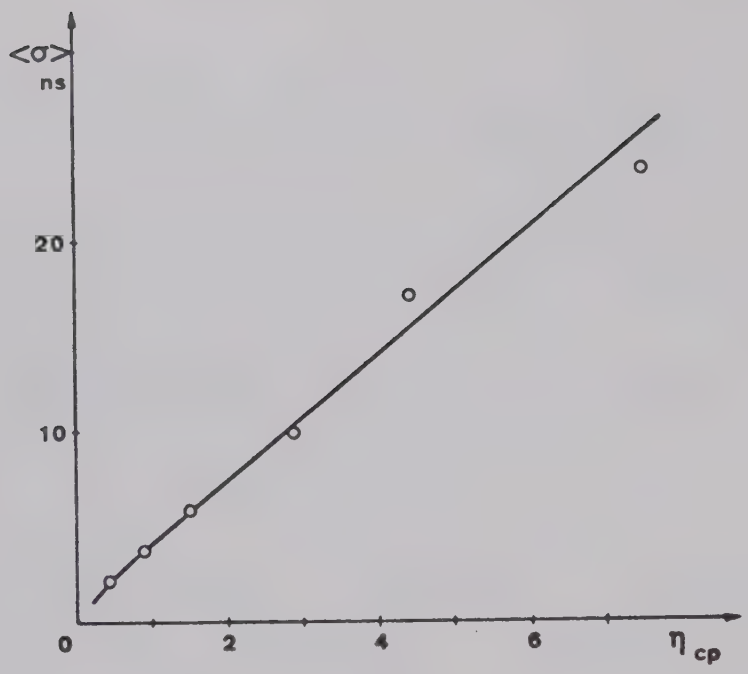


Fig. III-21 : Variations du temps de relaxation moyen $< \sigma >$ en fonction de la viscosité (PS - DPA).

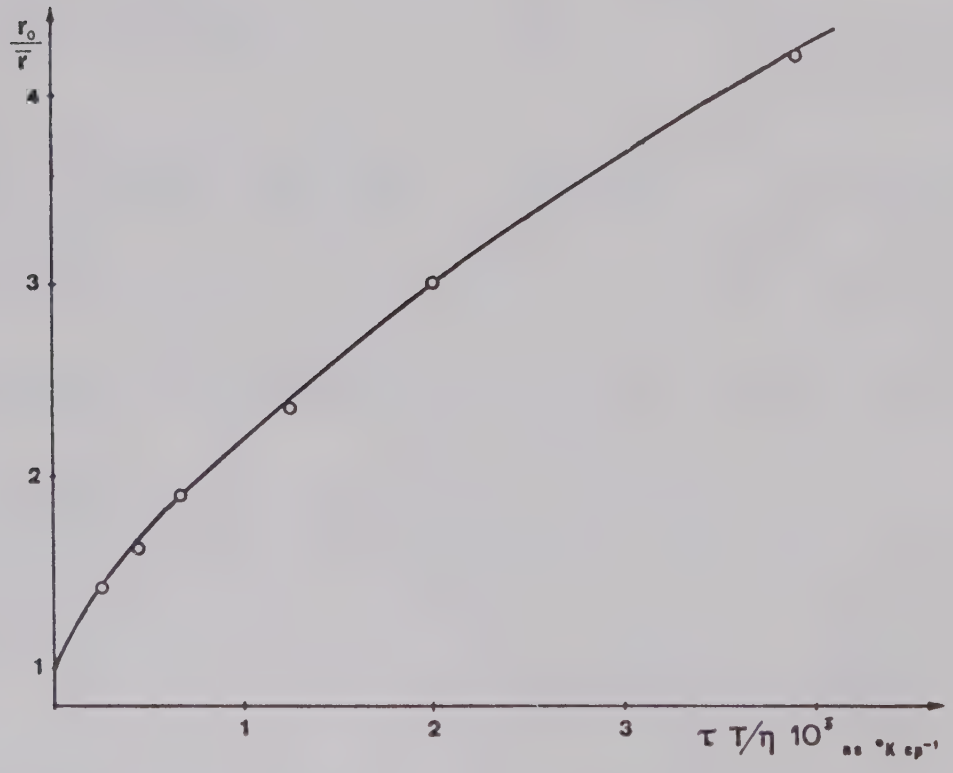


Fig. III-22 : Variations du rapport $r_o/\bar{r}$ en fonction de $\tau T/\eta$ (PS - DPA).

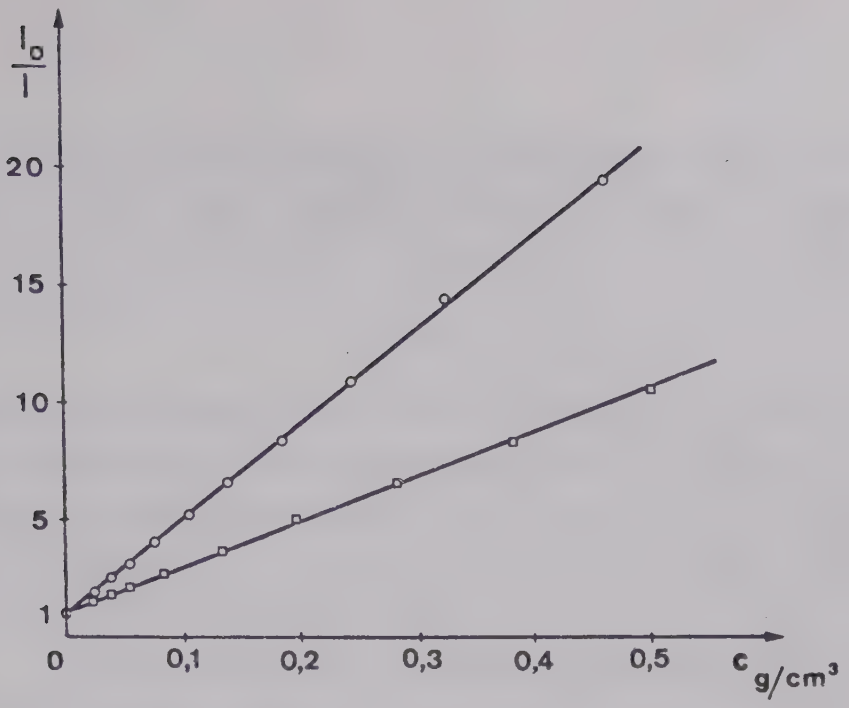


Fig. III-23 : Variations du rapport I_o/I en fonction de la concentration en inhibiteur (PS - DPA).

○ solution dans le dichloro-1,2 éthane

□ solution dans le chloroforme

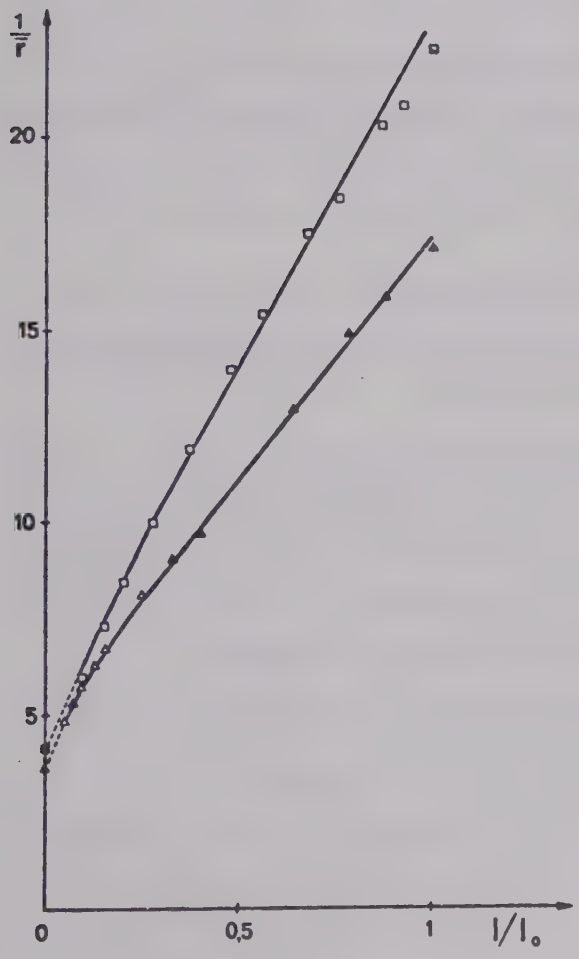


Fig. III-24 : Variations de $1/\bar{r}$ en fonction de I/I_o

△ solution dans le dichloro-1,2 éthane

□ solution dans le chloroforme

En effet, les courbes de déclin de l'anisotropie ont montré que la fonction d'autocorrélation n'était pas une exponentielle simple et par conséquent une loi du type :

$$\frac{1}{\bar{r}} = \frac{1}{r_o} \left(1 + \frac{3\tau}{\rho}\right)$$

ne doit pas être vérifiée par les expériences d'inhibition et de polarisation de fluorescence. D'ailleurs les valeurs de $1/\bar{r}$ extrapolées à $I/I_o = 0$ à partir de la droite moyenne sont supérieures aux valeurs de $1/r_o$ déterminées par la technique de décroissance.

En conclusion, les mesures du déclin de l'anisotropie d'une part, et les mesures d'inhibition et de polarisation de fluorescence d'autre part ont révélé, dans le cas d'un polystyrène portant un fluorophore dont le moment de transition est suivant l'axe de la chaîne, que l'accord avec la théorie proposée était satisfaisant.

En outre, le temps de relaxation θ, caractéristique des mouvements provoquant une perte d'orientation varie en fonction de la viscosité selon une loi du type :

$$\theta = a + b\,\eta$$

Par ailleurs l'influence de la qualité du solvant au sens thermodynamique montre que la relaxation de la chaîne est d'autant plus rapide que le facteur d'expansion est plus grand.

Enfin la relaxation du polystyrène observée par polarisation de fluorescence, diffère notablement selon que le moment de transition du fluorophore est dirigé suivant l'axe de la chaîne principale ou perpendiculairement à celle-ci. Dans ce dernier cas, la relaxation est plus rapide et l'allure de la fonction d'autocorrélation est un peu différente.

C O N C L U S I O N

L'utilisation de la polarisation de la lumière de fluorescence émise par une macromolécule, portant un fluorophore, pour l'étude du mouvement brownien des chaînes en solution, nous a amené à examiner, d'un point de vue théorique, à la fois le mouvement brownien et la polarisation de fluorescence.

L'analyse théorique du modèle d'une chaîne inscrite dans un réseau tétraédrique et soumise à des mouvements à trois liaisons a conduit à l'expression suivante de la fonction d'autocorrélation d'orientation d'une liaison interne :

$$M_2(t) = e^{t/\rho}\ \mathrm{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}}$$

Le comportement aux temps longs de cette fonction est en $t^{-1/2}$.

Pour refléter le comportement d'une chaîne réelle, il faut tenir compte du fait que la chaîne n'évolue pas strictement dans un réseau tétraédrique. L'effet des écarts se traduit par une contribution exponentielle et la fonction d'autocorrélation peut se mettre sous la forme :

$$M_2(t) = e^{-t/\theta}\ e^{t/\rho}\ \mathrm{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}}$$

dont le comportement aux temps longs n'est plus en $t^{-1/2}$ mais en $t^{-1/2}\ e^{-t/\theta}$.

Cette expression a été mise à profit pour exprimer l'anisotropie instantanée d'émission d'un fluorophore inséré dans une chaîne macromoléculaire :

$$r(t) = r_o\ e^{-t/\theta}\ e^{t/\rho}\ \mathrm{erfc}\sqrt{\frac{t}{\rho}}$$

ainsi que l'anisotropie fondamentale du fluorophore et τ sa durée de vie.

Le contrôle de la validité de cette théorie a été faite par polarisation de fluorescence et plus particulièrement par la technique du déclin de la fluorescence polarisée, grâce à un appareil et une méthode

d'analyse des courbes mis au point au cours de ce travail. Les mesures ont porté sur un polystyrène possédant un flùorophore anthracénique inséré dans la chaîne dont le moment de transition est dirigé dans l'axe de la chaîne. La méthode d'insertion consistait à coupler deux chaînes vivantes monofonctionnelles de polystyrène à l'aide du bis(bromométhyl)-9,10 anthracène.

Les mesures du déclin de l'anisotropie effectuées dans des mélanges acétate d'éthyle-tripropionine ont révélé un bon accord entre les courbes expérimentales et la fonction d'autocorrélation théorique proposée. Cependant un écart aux temps très courts est observé. L'utilisation de flashes plus courts permettra ultérieurement de contrôler si ces écarts ont un sens, ou bien s'ils sont dûs uniquement à la fonction de transfert de l'appareil.

Des mesures couplées d'inhibition et de polarisation de fluorescence ont été effectuées sur ce même polymère. L'accord avec la théorie proposée s'est avéré très satisfaisant.

En ce qui concerne l'influence de la viscosité nous avons pu montrer que le temps de relaxation moyen variait selon une loi non linéaire aux faibles viscosités et que le temps de relaxation θ, reflétant les effets des écarts par rapport au réseau diamant obéissait à une relation du type :

$$\theta = a + b\eta$$

En outre, les courbes de déclin enregistrées dans divers solvants ont confirmé le fait que la relaxation de la chaîne est plus rapide lorsque sa conformation moyenne est plus étendue.

Enfin, nous avons analysé l'influence de la direction du moment de transition d'émission du fluorophore par rapport à la chaîne, en comparant le comportement du polystyrène précédemment étudié et celui d'un polystyrène possédant un groupement diphényl-9,10 anthracène fixé latéralement. Le moment de transition de ce dernier est perpendiculaire à la chaîne et, conformément aux prévisions, la relaxation observée est nettement plus rapide que dans le cas précédent. De plus, la forme de la fonction d'autocorrélation est un peu différente.

Il ressort de notre étude que la méthode de polarisation de fluorescence est bien adaptée à l'étude de la dynamique des chaînes macromoléculaires. En particulier la technique du déclin de la fluorescence polarisée, complétée par le traitement des résultats par la méthode des fonctions modulatrices, s'avère très puissante pour analyser de façon détaillée les phénomènes de relaxation d'orientation. Les limitations actuelles devraient être levées avec l'accès à des flashes plus courts (10 à 100 ps) possédant néanmoins des cadences de répétition suffisantes ($>$10 kHz).

L'analyse effectuée dans ce travail sur les relaxations du polystyrène montre qu'il est maintenant possible d'examiner l'influence de la structure chimique de la chaîne sur ses propriétés dynamiques et par là même, de préciser les mouvements contribuant à ces processus de relaxation.

ANNEXE : METHODE DES FONCTIONS MODULATRICES.

1°/ Choix des fonctions modulatrices.

LOEB a proposé des fonctions du type :

$$\phi(t) = t^n (T - t)^n F(t) \qquad (A1)$$

où F(t) est une fonction quelconque mais dérivable n-1 fois. De telles fonctions ϕ et leurs dérivées jusqu'à l'ordre n-1 compris s'annulent effectivement pour t = 0 et t = T. F(t) permet de choisir à volonté le nombre de passages par zéro de $\phi(t)$ dans l'intervalle [0, T] , ce qui peut être pris comme critère d'"individualité" d'une fonction ϕ (Figure A1).

Cependant, de telles fonctions ne peuvent convenir dans le cas de l'analyse de la fluorescence. En effet, on dispose de courbes expérimentales sous forme digitale contenant un nombre limité de points; il faut donc éviter un trop grand nombre d'oscillations des fonctions modulatrices et de leurs dérivées. A titre d'exemple, le nombre de passages par zéro de la dérivée tierce d'une fonction du type ε (Figure A1) est de 6.

En outre, dans le cas de la fluorescence, la modulation ne doit pas être importante aux temps longs pour lesquels le rapport signal/bruit est plus faible, et la modulation du flash peu efficace.

Ces remarques nous ont conduits à choisir des fonctions modulatrices du type

$$\phi(t) = t^n (T - t)^p \qquad (A2)$$

où T est la durée de l'enregistrement. Ces fonctions présentent l'avantage d'être très simples à calculer. D'autre part, il est possible de régler à volonté la position du maximum (définie par :

$$t_{max} = \frac{n}{n + p} T$$

) en agissant sur les valeurs de n et p (Figure A2). Le choix optimum de celles-ci dépend théoriquement des

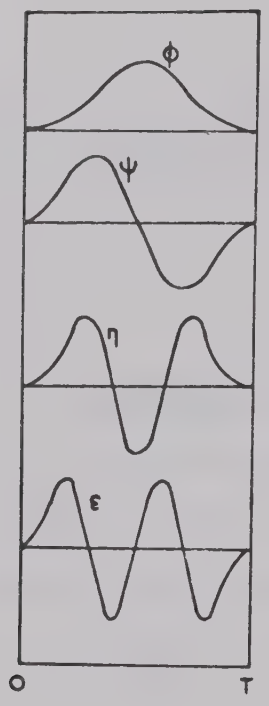


Fig. A1 : Fonctions modulatrices du type $t^n(T-t)^n F(t)$

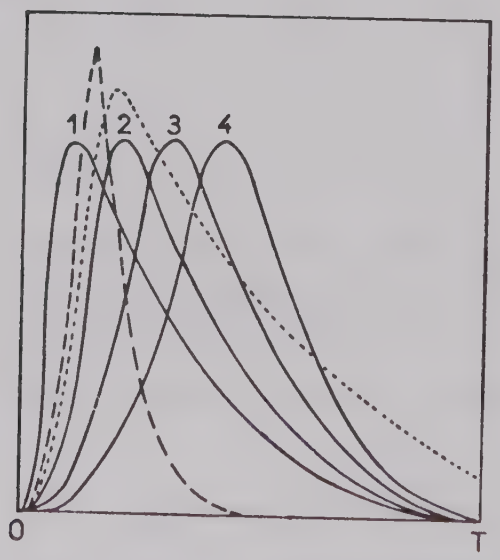


Fig. A2 : ------ flash

..... R(t)

——— fonctions modulatrices du type $t^n(T-t)^p$:

Courbe 1 : n = 4, p = 31
Courbe 2 : n = 4, p = 14
Courbe 3 : n = 4, p = 8
Courbe 4 : n = 4, p = 5

paramètres caractérisant la décroissance, paramètres que l'on ne connait évidemment pas a priori; aussi est-il délicat d'envisager une méthode automatique d'optimisation des fonctions modulatrices. Celles-ci ont été choisies de telle sorte que leurs maxima soient répartis de façon régulière et ce, sans dépasser les deux premiers tiers de l'intervalle [0, T] pour les raisons évoquées ci-dessus (modulation faible aux temps longs).

Parmi les couples d'exposants qui ont été essayés, ceux qui ont donné de bons résultats sont indiqués dans le tableau A1

2°/ - Tests de la méthode sur ordinateur

Le flash a été simulé par la fonction :

$$P(t) = \frac{A_o}{T_o}\, t \exp\left(\frac{T_o - t}{T_o}\right)$$

L'intégrale de convolution

$$R(t) = \int_o^t P(\tau)\, S(t - \tau)\, d\tau$$

peut alors être calculée explicitement :

$$R(t) = \sum_{i=1}^{N} \frac{A_i A_o T_i}{T_i - T_o} \left[\theta \exp\left(1 - \frac{t}{T_i}\right) - (t + \theta) \exp\left(1 - \frac{t}{T_o}\right)\right]$$

avec $\quad \frac{1}{\theta} = \frac{1}{T_o} - \frac{1}{T_i}$

Nous avons pris T_o = 1 ns ce qui correspond à une largeur du flash à mi-hauteur de 2,4 ns. C'est la largeur maximale des flashs utilisés dans la plupart des cas.

Le nombre de points définissant les courbes expérimentales a été choisi égal à 200. L'intervalle de temps séparant deux points sera représenté par Δt.

Les calculs ont été effectués sur un ordinateur IBM 1130. A titre indicatif, signalons qu'une décomposition en 3 exponentielles nécessite un temps de calcul d'environ 3 minutes).

N	n	p	t_{max}/T
1	4	31	0,114
	4	8	0,333
2	4	31	0,114
	4	14	0,222
	4	8	0,333
	4	5	0,444
3	4	31	0,114
	4	14	0,222
	4	8	0,333
	4	5	0,444
	5	4	0,555
	8	4	0,666

Tableau A1 : Exemples de couples d'exposants intervenant dans les fonctions modulatrices du type

$$t^n(T - t)^p$$

(N : nombre d'exponentielles recherchées).

T_1 théor.	T_1 calc.	A_1 théor.	A_1 calc.
2	2,0000	10	9,9999
4	4,0000	10	9,9999
10	10,000	10	9,9999
25	25,000	10	9,9999
40	40,000	10	9,9999
60	60,001	10	9,9999

Tableau A2 : Résultats relatifs au cas de 1 exponentielle

$S(t) = A_1 \exp(-\frac{t}{T_1})$ $\Delta T = 0,2$ ns $T = 40$ ns.

Remarque : Les résultats sont souvent présentés avec un grand nombre de décimales pour mieux mettre en valeur la précision théorique qui est évidemment très différente de la précision expérimentale soumise à l'influence du bruit.

a/ - Cas de 1 exponentielle.

Les couples d'exposants (n, p) utilisés sont donnés dans le tableau A1.

Les amplitudes reportées dans le tableau A2 ont été calculées par la méthode directe (c'est-à-dire à partir du coefficient α_1).

La précision des résultats est excellente. Remarquons en outre que l'analyse de courbes correspondant à des constantes de temps supérieures à T est possible du point de vue théorique c'est-à-dire en l'absence de bruit.

b/ - Cas de 2 exponentielles.

Les valeurs choisies pour n et p sont celles du tableau A1.

Les amplitudes qui sont données dans le tableau A3 ont été calculées par la méthode directe. La méthode des moments incomplets a fourni des résultats voisins à moins de 1% près.

-Effet de la troncature : pour un même couple de constantes de temps, l'influence de la troncature a été étudiée en faisant varier la valeur de T, limite supérieure de l'intervalle d'enregistrement, tout en conservant un nombre de points égal à 200 pour définir celui-ci. On constate, comme prévu, que l'effet de cette troncature est faible.

- Résolution : les résultats montrent qu'il est théoriquement possible, de distinguer deux exponentielles dont les constantes de temps diffèrent de 1 ns.

- Influence du rapport des amplitudes : le tableau A3 révèle que pour un rapport de 20, les calculs restent satisfaisants.

	Valeurs théoriques		Valeurs calculées		Valeurs théoriques		Valeurs calculées	
Δt	T_1	T_2	T_1	T_2	A_1	A_2	A_1	A_2
Effet de la troncature								
0,4	4	10	4,0012	10,000	10	10	10,20	9,73
0,2	"	"	4,0000	9,9999	"	"	10,006	9,991
0,1	"	"	4,0009	10,001	"	"	10,005	9,994
0,4	20	30	20,001	30,001	10	10	10,12	9,88
0,2	"	"	19,98	29,97	"	"	9,97	10,003
0,1	"	"	19,94	29,86	"	"	9,84	10,16
Résolution								
0,2	4	5	4,004	5,004	10	10	10,11	9,89
0,2	9	10	8,92	9,93	"	"	8,48	11,52
Amplitudes différentes								
0,2	4	10	4,0002	10,006	10	0,5	10,007	0,490
0,2	4	10	3,993	9,9996	0,5	10	0,496	10,004

Tableau A3 : Résultats relatifs au cas de 2 exponentielles :

$$S(t) = A_i \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$

Δt ns	T ns
0,1	20
0,2	40
0,4	80

c/ - Cas de 3 exponentielles.

Les valeurs de n et p données dans le tableau A1 ont été utilisées.

Les résultats sont reportés dans le tableau A4. Les valeurs des amplitudes qui y figurent ont été calculées par la méthode des moments incomplets qui a donné de meilleurs résultats que la méthode directe.

d/ - Détermination du nombre de composantes.

En général, on ne connaît pas a priori, le nombre d'exponentielles contenues dans une courbe expérimentale. L'avantage de la méthode des fonctions modulatrices réside dans le fait que le système ne devient pas indéterminé lorsque l'on cherche davantage de composantes qu'il n'en existe; des valeurs nulles doivent alors être attribuées aux amplitudes et aux constantes de temps des exponentielles absentes.

En effet, comme le montre le tableau A5, les amplitudes calculées sont très petites; elles sont d'ailleurs souvent négatives. Les constantes de temps, bien que n'étant pas petites, sont presque toujours négatives. Dans tous les cas, l'élimination de ces exponentielles "fictives" est aisée.

Si l'on se limite à 3 composantes, il suffit donc théoriquement de rechercher toujours 3 exponentielles et de ne pas tenir compte des exponentielles "fictives". Mais plus le nombre de composantes cherchées est grand, moins bonne est la précision, surtout en présence de bruit. Dans la pratique, il est donc préférable de chercher 1, 2 puis 3 composantes et de faire le tri.

Par ailleurs, il est souhaitable de reconvoluer avec le flash la courbe théorique obtenue S(t) et d'essayer de superposer la courbe résultante $R(t)_{théorique}$ avec $R(t)_{exp}$.

Il est intéressant de remarquer qu'il est possible d'éliminer une composante continue parasite (bruit de fond) en cherchant une exponentielle de plus qu'il n'est nécessaire. En effet une composante continue peut

Valeurs théoriques			Valeurs calculées			Valeurs théoriques			Valeurs calculées		
T_1	T_2	T_3	T_1	T_2	T_3	A_1	A_2	A_3	A_1	A_2	A_3
4	9	14	3,98	8,96	13,98	10	10	10	10,65	9,75	10,29
4	7	10	3,99	6,97	9,99	10	10	10	10,86	9,49	10,34
4	6	8	3,97	5,92	7,98	10	10	10	11,05	8,96	10,70

Tableau A4 : Résultats relatifs au cas de 3 exponentielles

$$S(t) = A_1 \exp(-\frac{t}{T_1}) + A_2 \exp(-\frac{t}{T_2}) + A_3 \exp(-\frac{t}{T_3}) \quad ; \Delta t = 0,4 \text{ ns}$$

Valeurs théoriques			Valeurs calculées			Valeurs théoriques			Valeurs calculées		
T_1	T_2	T_3	T_1	T_2	T_3	A_1	A_2	A_3	A_1	A_2	A_3
10	0	-	10,000	12,38	-	10	0	-	10,015	$-1,6\ 10^{-2}$	-
4	0	-	4,0000	-11,57	-	10	0	-	10,000	$-3,6\ 10^{-5}$	-
2	0	-	2,000	-18,65	-	10	0	-	9,9999	$-3,8\ 10^{-5}$	-
4	10	0	4,0003	10,000	- 3,3	10	10	0	10,32	10,06	2.10^{-13}
10	0	0	10,000	- 4,8	- 1,6	10	10	0	10,14	$8\ 10^{-22}$	2.10^{-8}
10	∞	-	10,000	58	-	10	CC 1%	-	10,001	$-1,6\ 10^{-5}$	-
10	∞	-	9,9998	19.10^{3}	-	10	CC 10%	-	10,003	$-3,6\ 10^{-5}$	-
4	10	∞	4,0004	10,000	-28,1	10	10	CC 1%	10,325	10,055	5.10^{-17}
4	10	∞	3,993	10,006	73,8	10	10	CC 10%	10,58	10,196	-0,33

Tableau A5 : Détermination du nombre de composantes; CC : composante continue en % de la valeur maximale de R(t).

être considérée comme une exponentielle de constante de temps infinie. Le tableau A5 montre qu'une telle élimination est possible.

e/ - Influence du bruit.

Dès que l'on envisage un nombre d'exponentielles supérieur à 1, le calcul direct de l'influence du bruit s'avère extrêmement difficile. On peut cependant dégager quelques considérations générales d'après les articles de LOEB précédemment cités.

Si le bruit est stationnaire, l'espérance mathématique des coefficients de la matrice du système linéaire, et par suite des paramètres recherchés, est nulle. D'autre part, la variance suit une loi en $1/\sqrt{T}$, ce qui définit ainsi une limite à la troncature des courbes expérimentales pour un niveau de bruit donné.

B I B L I O G R A P H I E

[1] - J.G. KIRKWOOD, J. Polym. Sci., 12, 1 (1954)

[2] - P.E. ROUSE, J. Chem. Phys., 21, 1272 (1953)

[3] - F. BUECHE, J. Chem. Phys., 22, 603 (1954)

[4] - B.H. ZIMM, J. Chem. Phys., 24, 269 (1956)

[5] - M. FIXMAN, J. Chem. Phys., 45, 785 (1966)

[6] - C.W. PYUN et M. FIXMAN, J. Chem. Phys., 44,2107 (1966)

[7] - R. CERF, J. Chim. Phys., 48, 59 (1951)
J. Chim. Phys., 66, 479 (1969)

[8] - P.H. VERDIER et W.H. STOCKMAYER,
J. Chem. Phys., 36, 227 (1962)

[9] - P.H. VERDIER, J. Chem. Phys., 45,2122 (1966)
J. Chem. Phys., 52,5512 (1970)

[10] - L. MONNERIE et F. GENY, J. Chim. Phys., 66,1691 (1969)
J. Polym. Sci., Pt C, 30, 93 (1970)

[11] - L. MONNERIE, Thèse Doctorat ès-Sciences, Paris, 1968

[12] - R.A. ORWOLL et W.H. STOCKMAYER,
Adv. Chem. Phys., 15, 305 (1969)

[13] - W.H. STOCKMAYER, W. GOBUSH, Y. CHIKAHISA et D.K. CARPENTER,
Disc. Far. Soc., 49, 182 (1970)

[14] - K. IWATA et M. KURATA, J. Chem. Phys., 50, 4008 (1969)

[15] - E. DUBOIS-VIOLETTE, F. GENY, L. MONNERIE et O. PARODI,
J. Chim. Phys., 66, 1865 (1969)
E. DUBOIS-VIOLETTE, Thèse Doctorat ès-Sciences, Paris 1971.

[16] - K. IWATA, J. Chem. Phys., 54, 12 (1971)

[17] - T.F. SCHATZKI, Polymer preprints, 6,(2) 646 (1965)

[18] - W. PECHHOLD, S. BLASENBREY et S. WOERNER,
Kolloïd Z.Z. Polymere, 189, 14 (1963)

[19] - E. HELFAND, J. Chem. Phys., 54, 4651 (1971)

[20] - K. IWATA, J. Chem. Phys., 58, 4184 (1973)

[21] - B. VALEUR, L. MONNERIE et J.P. JARRY, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 278C, 589 (1974)

B. VALEUR, J.P. JARRY, F. GENY et L. MONNERIE, J. Polymer Sci., Polyl. Phys. Ed., sous presse

B. VALEUR, L. MONNERIE et J.P. JARRY, J. Polymer Sci., Polym. Phys. Ed., sous presse

[22] - B. VALEUR et L. MONNERIE, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, sous presse

[23] - J.B. KINSINGER dans: Markov chains and Monte-Carlo calculations in polymer science (Ed. par G.G. LOWRY), Marcel DEKKER, New York, 1970, chap. 4.

[24] - B.I. HUNT et J.G. POWLES, Proc. Phys. Soc., 88, 513 (1966).

[25] - S.H. GLARUM, J. Chem. Phys., 33, 639 (1960).

[26] - F. GENY et L. MONNERIE, à paraître.

[27] - P.M. MORSE et H. FESHBACH, Methods of Theoretical Physics, Mc. GRAWHILL, 1953, p. 812.

[28] - A. JABLONSKI, Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. Sci. math. astr. et Phys., 8, 259 (1960).

[29] - F. PERRIN, J. Phys. Rad., 7, 390 (1926). Ann. Phys., 12, 169 (1929).

[30] - A. JABLONSKI, Acta Phys. Polon., 38, 717 (1965).

[31] - L. MONNERIE et J. NEEL, J. Chim. Phys., 62, 504 (1965).

[32] - E.A. BAILEY et G.K. ROLLEFSON, J. Chem. Phys., 21, 1315 (1953).

[33] - R.D. SPENCER et G. WEBER, Ann. New-York Acad. Sci., 158, 361 (1969)

[34] - O.J. STEINGRABER et I.B. BERLMAN, Rev. Sci. Instr. 34, 524 (1963).

[35] - L. HUNDLEY, T. COBURN, E. GARWIN et L. STRYER, Rev. Sci. Inst. 38, 488 (1967).

[36] - M.C. STUDER, U.P. WILD et H.H. GUNTHARD, J. Phys. , E, 3, 847 (1970).

[37] - Y. KOECHLIN, Thèse Doctorat ès-Sciences, Paris, 1961.

[38] - G. LAUSTRIAT, G. PFEFFER, H. LAMI et A. COCHE, C.R. Acad. Sci. Paris, 257, 434 (1963).

[39] - T. TAO, Biopolymers, 8, 609 (1969).

[40] - J. YGUERABIDE, H.F. EPSTEIN et L. STRYER, J. Mol. Biol., 51, 573 (1970).

[41] - R. SCHUYLER et I. ISENBERG, Rev. Sci. Inst., 42, 813 (1971).

[42] - A.E.W. KNIGHT et B.K. SELINGER, Aust. J. Chem., 26, 1 (1973).

[43] - C. LEWIS, W.R. WARE, L.J. DOEMENY et T.L. NEMZEK, Rev. Sci. Inst. 44, 107 (1973).

[44] - J.A. MIEHE, G. AMBARD, J. ZAMPACH et A. COCHE, I.E.E.E. Trans. Nucl. Sci., NS 17, 115 (1970)

[45] - I.B. BERLMAN Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules, Academic Press, New-York 1965.

[46] - D.G. GARDNER, J.C. GARDNER, G. LAUSH et W.W. MEINKE, J. Chem. Phys., 31, 978 (1959).

[47] - I. ISENBERG et R.D. DYSON, Biophys. J. 9, 1337 (1969).

[48] - I. ISENBERG, R.D. DYSON et R. HANSON, Biophys. J., 13, 1090 (1973).

[49] - W.P. HELMAN, Int. J. Radiat. Phys. Chem., 3, 283 (1971).

[50] - M. ALMGREN, Chemica Scripta., 3, 145 (1973).

[51] - A. BERNALTE et J. LE PAGE, Rev. Sci. Inst., 40, 71 (1969).

[52] - J.N. DEMAS et A.W. ADAMSON, J. Phys. Chem., 75, 2463 (1971).

[53] - A.E.W. KNIGHT et B.K. SELINGER, Spectrochimica Acta, 27A, 1223 (1971).

[54] - B.H. WORSLEY et L.C. LAX, Biophys. Biochim. Acta, 59, 1 (1962).

[55] - W.R. WARE, L.J. DOEMENY et T.L. NEMZEK, J. Phys. Chem., 77, 2038 (1973).

[56] - J. LOEB, Identification expérimentale des processus industriels - DUNOD, Paris, 1967.

[57] - J. LOEB et G. CAHEN, Automatisme, 8, 479 (1963).

[58] - J. LOEB, I.E.E.E. Trans. on Automatic Control AC-10, 359 (1965).

[59] - B. VALEUR et J. MOIREZ, J. Chim. Phys. 70, 500 (1973).

[60] - F. PERRIN, J. Phys. Rad., 5, 497 (1934); 7, 1 (1936).

[61] - R. MEMMING, Z. Phys. Chem., 28, 168 (1961).

[62] - Ph. WAHL, G. MEYER, J. PARROD, Eur. Polym. J., 6, 585 (1970).

[63] - G. WEBER, Biochem. J., 51, 145 (1952).

[64] - G. WEBER, J. Chem. Phys., 55, 2399 (1971).

G.G. BELFORD, R.L. BELFORD, G. WEBER, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1392 (1972).

[65] - M. ERHENBERG et R. RIGLER, Chem. Phys. Lett., 14, 539 (1972).

[66] - T.J. CHUANG et K.B. EISENTHAL, J. Chem. Phys., 57, 5094 (1972).

[67] - Ph. WAHL, Thèse Doctorat ès-Sciences, Strasbourg (1962).

[68] - E. HEINTZ, J. Chim. Phys., 48, 545 (1951).

[69] - G. WEILL, Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 272B, 116 (1971).

[70] - G. WEBER et J.R. LAKOWICZ, Chem. Phys. Lett., 22, 419 (1973).

[71] - T. BRECHBULLER et M. MAGAT, J. Chim. Phys., 47, 679 (1950).

[72] - M. FREY, Ph. WAHL et H. BENOIT, J. Chim. Phys., 61, 1005 (1964).

[73] - D. BIDDLE et T. NORDSTROM, Ark. Kemi., 32, 359 (1970).

[74] - Ph. WAHL, J. Polym. Sci., 29, 375 (1958).

[75] - A. TERAMOTO, M. MORIMOTO et Y. NISHIJIMA, J. Polym. Sci., Pt A2, 5, 1021 (1967).

[76] - Y. NISHIJIMA, A. TERAMOTO, M. YAMAMOTO et S. HIRATSUKA, J. Polym. Sci., Pt A2, 5, 23 (1967).

[77] - E.V. ANUFRIEVA, M.V. VOL'KENSHTEIN, M.G. KRAKOVYAK et T.V. SHEVELEVA, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 182, 361 (1968) Dokl. Akad. Nauk SSSR, 186, 854 (1969).

[78] - L. MONNERIE et S. GORIN, J. Chim. Phys., 67, 400 (1970).

[79] - B. VALEUR, Thèse 3ème cycle, Paris, 1970.

B. VALEUR, C. NOEL, P. MONJOL, L. MONNERIE, J. Chim. Phys., 68, 97 (1971).

[80] - E.V. ANUFRIEVA, M.V. VOL'KENSHTEIN, Yu.Ya. GOTLIB, M.G. KRAKOVYAK, S.S. SKOROKHODOV et T.V. SHEVELEVA, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 194, 1108 (1970).

[81] - E.V. ANUFRIEVA, M.V. VOL'KENSHTEIN, M.G. KRAKOVYAK et T.V. SHEVELEVA, Dokl. Akad. Nauk SSR, 200, 358 (1971).

[82] - H. TANAKA, T. YANAGIDA, A. TERAMOTO et M. FUJITA, J. Phys. Chem., 71, 2416 (1967).

[83] - S. GORIN, Thèse Doctorat ès-Sciences, Paris (1968).

[84] - D. BIDDLE, Ark. Kemi., 29, 543 (1968).

[85] - Ph. WAHL, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 260 , 6891 (1965).

[86] - A.M. NORTH et I. SOUTAR, J. Chem. Soc., Far. Trans.I, 68, 1101 (1972)

[87] - K. BROWN et I. SOUTAR, Eur. Polym. J., 10, 433 (1974).

[88] - M.G. KRAKOVYAK, E.V. ANUFRIEVA, N.S. SHELEKHOV et S.S. SKOROKHODOV, Eur. Polym. J., 10 (8), 685 (1974).

[89] - G.FINAZ, Y. GALLOT, J. PARROD et P. REMPP, J. Polym. Sci., 58, 1363 (1962).

[90] - B.W.MILLER, R.W. AMIDOW et P.O. TAWNEY, J. Amer. Chem. Soc., 77, 2845 (1955).

[91] - J.H. GOLDEN, J. Chem. Soc., 3741 (1961)

[92] - S.R. VELKOVIC, Trans. Far. Soc., 53, 1181 (1957).

[93] - E.J. BOWEN et K. WEST, J. Chem. Soc., 4394 (1955).

[94] - D.K. MAJUMDAR et S. BASU, J. Chem. Phys., 33, 1199 (1960).

[95] - J. RISEMAN et J.G. KIRKWOOD, J. Chem. Phys., 17, 442 (1949).

[96] - R. CERF, Chem. Phys. Letters, 22, 613 (1973).
Chem. Phys. Letters, 24, 317 (1974).

[97] - J.E. ANDERSON, K.J. LIU et R. ULLMAN,
Dis. Far. Soc., 49, 257 (1970).

[98] - G. WEILL et G. HERMANN, Suppl. J. Phys., 32, C5A, 269 (1971).

[99] - G. HERMANN, Thèse Doctorat ès-Sciences, Strasbourg (1973).

[100] - M.C. LANG, Thèse de 3ème cycle, Paris (1974).

[101] - A. KATCHALSKY et H. EISENBERG,
J. Polym. Sci., 6, 145 (1951).

[102] - A. JABLONSKI, Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. sci. math.
astr. et phys., 8, 655 (1960).

[103] - A. KAWSKI, Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. sci. math.
astr. et phys., 6, 533 (1958).

[104] - L.A. SPEKTOROV, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 65, 485 (1949).

[105] - D.C. CHAKRAVARTI, S.C. GANGULY,
Trans. Far. Soc. 37, 562 (1941).

[106] - R.K. BAUER, Acta Phys. Polon., 35, 101 (1969).

[107] - H.A. KRAMERS, Physica, 7, 284 (1940).

[108] - A.T. BULLOCK, G.G. CAMERON et P.M. SMITH,
J. Chem. Soc., Far. Trans. II, 70, 1202 (1974).

[109] - J.P. BENTZ, Thèse 3ème cycle, Strasbourg (1974).

[110] - B. VALEUR, P. REMPP et L. MONNERIE,
Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 279C,
1009 (1974).